

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 499**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2009 PCT/GB2009/002754**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10061186**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09795795 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2367942**

54 Título: **Método para la transformación de plastidios de células vegetales**

30 Prioridad:

25.11.2008 GB 0821516

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.05.2017

73 Titular/es:

**ALGENTECH SAS (100.0%)
Pépinière Genepole Enterprise 4, rue Pierre
Fontaine
91000 Evry Cedex 58, FR**

72 Inventor/es:

**MALCUIT, ISABELLE y
SOROKIN, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 614 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la transformación de plastidios de células vegetales

La presente invención se relaciona con un método para producir especie de ARN heteróloga o exógena en material de células vegetales tal como células vegetales transformadas genéticamente en cultivos, tejidos de planta y plantas derivadas a partir de células vegetales transformadas genéticamente. En particular, el método se relaciona con un método más eficiente para producir especies de ARN y/o proteínas heterólogas o exógenas en plastidios comprendidos en material de células vegetales, el material genético requerido para ello, tal como ADN y ARN, vectores, células anfitrionas, introducción de métodos de material genético en células vegetales, células vegetales que comprenden plastidios modificados genéticamente, y usos de los mismos.

Una desventaja de los métodos de transformación de plastidios vegetales de la técnica anteriores es que la eficiencia de transformación en términos de números de plastidios transformados por célula tiende a ser baja. Una desventaja adicional de los métodos de la técnica anterior es que el suministro de información genética en el plastidio tiende a ser errático en el sentido de que los mecanismos de suministro empleados dependen de la oportunidad para el suministro exitoso de información genética, tal como ARN, en el genoma del plastidio. Los métodos de la técnica anterior no se basan en procesos celulares endógenos eficientes para la transferencia de ARN en el genoma del plastidio, la transcripción inversa posterior y recombinación de este dentro del genoma del plastidio, y cuando se desea, seguido por la expresión de proteína de interés de la misma. Como tal, los procesos de la técnica anterior para modificar genéticamente los plastidios parecen ineficientes. Estas y otras desventajas de la tecnología de transformación de plastidios de la técnica anterior serán evidentes a partir de la descripción anterior.

Lutz, Kerry Ann et al: "A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants", Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, US LNKD-DOI:10.1104/PP.107.106963, vol. 145, no. 4, 1 de diciembre de 2007, páginas 1201-1210, enseña el suministro de un casete de transgén a sólo unos pocos de los plastidios de la cantidad total de los plastidios presentes en una células vegetales.

Los presentes inventores han encontrado que al utilizar o adaptar los procesos celulares endógenos para la transferencia de secuencias de polinucleótidos, tales como ARN, desde el citoplasma hasta el plastidio en la células vegetales, las secuencias de polinucleótidos derivados de la transformación nuclear del núcleo de una planta de células se puede transferir de manera eficiente o dirigir en el genoma del plastidio dentro de una células vegetales que se transforma de esta manera, y se expresa de manera más eficiente en el plastidio como se describe aquí. Adicionalmente, es evidente que una vez que el plastidio se transforma con secuencias de la invención, no es necesario que los transgenes codificados nucleares que se requieren para la transformación inicial del plastidio permanezcan en el genoma nuclear. Como consecuencia, se pueden eliminar los transgenes codificados nucleares a través de la segregación deliberada o natural en las siguientes generaciones de plantas. Para los propósitos de la presente invención los términos "plastidio" y "plastidios" y "población de plastidios" se utilizan de forma intercambiable, como lo son los términos "células vegetales" y "células vegetales", a menos que el contexto exija otra cosa. Al emplear o adaptar los procesos celulares endógenos para la transferencia de ARN derivado de las secuencias de polinucleótidos introducidos en el núcleo para el genoma del plastidio, tal como se describe aquí, se considera que el método de la invención es único sobre los métodos de la técnica anterior para la generación de células vegetales o plantas que poseen plastidios genéticamente modificados. La población de plastidios de la células vegetales se bombardea constantemente mediante ARN que se deriva del núcleo de la célula, que se lleva sobre la membrana de plastidios y en el plastidio donde se transcribe de forma inversa, se integra en el genoma y luego se transcribe, lo que resulta en la generación de ARN a partir del cual se pueden expresar las proteínas de interés.

Subsiste la necesidad de un método de transformación de plastidios más eficiente para la producción de ARN, y cuando se requiera, las proteínas de interés en los plastidios de células vegetales transformadas y tejidos de planta derivados de las mismas.

La base para la presente invención, que no parece haber sido realizada en la técnica anterior, es el suministro de una unidad de transformación de plastidio de planta que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican:

i) una unidad de transformación de plastidio de planta (PTU); ii) una transcriptasa inversa fusionada a una secuencia de péptidos de tránsito de cloroplasto derivada de planta; y iii) una proteína de unión de ARN fusionada a un péptido de tránsito de plastidio de planta. No parecen haber sido descritos o aludidos dichos sistemas de fusión de plastidios en la técnica anterior. Las modificaciones simples adicionales de esta clase de unidad de transformación de plastidio de planta incluyen aquellas que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican i) una unidad de transformación de plastidio de planta [PTU, por ejemplo, una unidad de transformación de cloroplasto (CTU)]; una secuencia de traslocación de plastidios de planta (PPS-5'), por ejemplo, una secuencia de translocación de cloroplastos (CTS-5'), fusionada al extremo 5' de la PTU; una secuencia de traslocación de plastidios de planta adicional (PPS-3'), por ejemplo una secuencia de translocación de cloroplastos (CTS-3') fusionada al extremo 3' de la CTU; y un dominio de unión de cebador diseñado para transcripción inversa en plastidios utilizando tRNA-Met de plastidio, tal como tRNA-Met(PBD-CHL) de cloroplasto. Al colocar el PBD-CHL junto al extremo 3' de la CTS-3', es decir, fuera del intrón LtrB como se

representa en la Figura 3 (A), la proteína Ltra es capaz de funcionar como una proteína de translocación y como fuente de la transcriptasa inversa. En dicha variante, no subsiste la necesidad de introducir un segundo gen para la funcionalidad de la transcriptasa inversa. En una segunda variante de este sistema, en el que el PBD (PBD-CYT) se diseña para interactuar con tRNA-Met citoplásmico endógeno, el PBD se ubica adyacente en el extremo 3' de la PTU (o, preferiblemente, una CTU) y una secuencia de translocación de plastidios, preferiblemente una secuencia de translocación de cloroplastos, se fusionan a esta en dirección 3'. En esta segunda variante, cuando se emplea un PBD que es capaz de unirse con tRNA-Met citoplásmico como cebador, la transcripción se inicia por la transcriptasa inversa endógena en el citoplasma utilizando tRNA-Met citoplásmico inverso. Por lo tanto, la segunda variante del sistema no requiere el cosuministro de una secuencia de ácidos nucleicos a la transcriptasa inversa para los plastidios, tales como cloroplastos. El uso de dichos sistemas de transformación de plastidios proporciona un rendimiento mejorado de ARN y por lo tanto la proteína de interés a partir de fuentes de plastidios que hasta ahora se ha alcanzado en la técnica anterior.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para transformar una células vegetales de acuerdo con la reivindicación 1.

La palabra "plastidio" para los propósitos de la presente invención abarca cloroplastos, proplastidios, etioplastos, cromoplastos, amiloplastos, leucoplastos y elaioplastos. Preferiblemente, el "plastidio" se refiere a cloroplastos. Para los propósitos de la descripción, los términos "cloroplasto" y "cloroplastos" se utilizan de forma intercambiable a menos que el contexto demande lo contrario como son los términos "plastidio" y "plastidios".

En una preferencia del método anterior, el casete de transgén de plastidio es un casete de transgén de cloroplasto, y la secuencia de traslocación de plastidios (PTS) es una secuencia de translocación de cloroplastos (CTS), y la proteína de transcriptasa inversa es una transcriptasa inversa de un retrotransposón o un retrovirus que se fusiona a un péptido de tránsito de cloroplasto para dirigirse en el cloroplasto.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para producir por lo menos una especie de ARN heteróloga o exógena en una planta de acuerdo con reivindicación 8.

Preferiblemente, la planta obtenida de acuerdo con el método anterior se hace crecer bajo condiciones en las que dicha especie de ARN heteróloga o exógena codificada por el transgén integrado en el plastidio se expresa como proteína heteróloga o exógena.

Naturalmente, el experto en la técnica entenderá que el promotor nuclear de la planta se une operativamente a las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas aquí acciona la expresión de dichas secuencias en el núcleo de la planta.

El "casete de transgén de plastidio" comprende una secuencia de flanqueo izquierda (LFS) y una secuencia de flanqueo derecha (RFS) que se utilizan para recombinación homóloga del casete en el genoma de plastidio. Entre las LFS y RFS se ubican por lo menos un promotor específico de secuencia de plastidios (tal como un promotor específico de cloroplasto, por ejemplo Prrn) y por lo menos una secuencia terminadora específica de plastidio (tal como un terminador específico de cloroplasto, por ejemplo la secuencia de 3'UTR del gen psbA del tabaco) que a su vez flanquea por lo menos un gen aislado o secuencia de ácidos nucleicos aislada de interés, tal como una secuencia de ADN recombinante (por ejemplo cADN) o una secuencia de ADN nativa introducida. La secuencia LFS y RFS puede incluir el promotor específico de cloroplasto y secuencias terminadoras, respectivamente, si por ejemplo, el ácido nucleico aislado de interés se fusiona un ácido nucleico de cloroplasto nativo de interés. Por lo tanto, el promotor y las secuencias terminadora necesariamente no se incluyen en la LFS o RFS, respectivamente *per se*, o entre la LFS y RFS si se inserta un transgén en el genoma del cloroplasto como una unidad de cistrón o si un transgén se fusiona traduccionalmente a un gen nativo. En tal caso, cuando un transgén se fusiona a una secuencia de codificación del cloroplasto nativo es después de que el evento de transformación ha tenido lugar que el promotor se puede encontrar en dirección 5' de la secuencia que es homóloga a la LFS en el genoma del cloroplasto y está disponible para conducir la expresión del gen fusionado al transgén de interés. Para los propósitos de la presente invención "transgén" incluye secuencias de ácidos nucleicos aisladas que en última instancia pueden dar lugar a la expresión de proteínas o péptidos de interés en el plastidio (por ejemplo, del cloroplasto) como se describe aquí. Por lo tanto, la secuencia de ácidos nucleicos aislada puede ser una que da lugar a una secuencia de ARN de interés que puede no codificar o dar lugar a la expresión de un producto traducible, o la secuencia de ácidos nucleicos aislada puede dar lugar a una secuencia de ARN que codifica o da lugar a la expresión de un producto traducible tal como una proteína o péptido de interés. El experto en la técnica también apreciará que el transgén que se lleva en el ácido nucleico aislado también se puede diseñar para dar lugar a una secuencia de ARN que da lugar a la expresión de un producto o productos traducible, y ARN intraducibles. Dichos ARN que no dan lugar a la expresión de proteínas pueden dar lugar a secuencias de ARN que contienen supresiones u otras mutaciones y estos pueden encontrar uso como herramientas de investigación para estudiar la función de genes en el plastidio, por ejemplo cloroplasto. Cuando el "transgén" da lugar a la expresión de proteínas o péptidos, los transgenes adecuados de interés incluyen proteínas de planta capaces de conferir las características deseadas para hacer crecer plantas y proteínas farmacéuticas para uso en mamíferos, que incluyen el hombre, tal como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como α -interferón, β -interferón, γ -interferón, factores de

5 coagulación de sangre seleccionados de Factor VII, VIII, IX, X, XI, y XII, hormonas de fertilidad, que incluyen la hormona luteinizante, factores de crecimiento hormonal que estimulan folículos, que incluyen factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos y similares, prolactina, oxitocina, hormona estimulante de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como la β -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, proteínas de estrés bióticas y abióticas, tales como proteínas tóxicas insecticida y de insectos, por ejemplo de, o derivada de *Bacillus thuringiensis*, proteínas nematocidas, proteínas de resistencia a herbicidas (por ejemplo, a glifosato), proteínas tolerantes a sal, proteínas tolerantes a sequía, proteínas de mejora nutricionales implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos, almidones, azúcares, alcaloides, vitaminas y vacunas comestibles, y similares.

10 Adicionalmente, el método de la invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos activos de los mismos y de enzimas industriales o fragmentos activos de las mismas.

Todas las proteínas mencionadas anteriormente son de tipo planta y humano. Otras proteínas que se contemplan para la producción en la presente invención incluyen proteínas para uso en el cuidado veterinario, y pueden corresponder a homólogos animales de las proteínas humanas, tales como las proteínas humanas mencionadas anteriormente.

15 Las LFS y RFS se pueden seleccionar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se pueden utilizar para recombinación homóloga en el plastidio. Los ejemplos adecuados incluyen secuencias de codificación tales como la secuencia que codifica los genes *psbA*, *rbcL* de cloroplastos.

20 El promotor de plastidio de planta se puede seleccionar de entre el grupo que consiste del promotor de polimerasa de ARN, elemento de promotor *rpo B*, elemento de promotor *atpB*, elemento de promotor *clpP*, elemento de promotor de *rADN 16S*, *PrbcL*, *Prps16*, el promotor *Prrn16*, *Prrn-62*, *Pycf2-1577*, *PatpB-289*, *Prps2-152*, *Prps16-107*, *Pycf1-41*, *Patp1-207*, *PclpP-511*, *PclpP-173*, *PaccD-129*, *PaccD-129* del gen *accD* del tabaco, el promotor *PclpP-53* del gen *clpP*, el promotor *Prrn-62* del gen *rrn*, el promotor *Prps16-107* del gen *rps16*, el promotor *PatpB/e-290* del gen de tabaco *atpB/e*, y el promotor *PrpoB-345* del gen *rpoB*. Adicionalmente, todos aquellos promotores que pertenecen a la clase III (Hajdukiewicz P T J et al. (1997) *EMBO J* 16:4041-4048) y todos los fragmentos de los promotores de clase II que controlan el inicio de la transcripción por NEP se pueden utilizar en el método de la invención. Dichos promotores o unidades estructurales de promotor en general no se conocen por estar muy conservados. La ATAGAATAAA se da como consenso cerca del sitio de inicio de la transcripción de los promotores NEP ((Hajdukiewicz P T J et al (1997) *EMBO J* 16:4041-4048).

30 El terminador de plastidio de planta, tales como un terminador de transcripción de cloroplasto se puede seleccionar de cualquier terminador de plastidios tales como *psbA*, *ATPA*, *rbcL* de región 3'-UTR, y terminadores de la transcripción bacteriana tales como *rrnB* descrito por Orosz A., et al., *Eur. J. Biochemistry*, 2005, Volume 201, Issue 3, pp 653-659.

Naturalmente, el experto en la técnica apreciará que otras secuencias de ADN terminadoras pueden estar presentes en las construcciones utilizadas en la invención.

35 El casete del transgén de plastidio de planta (por ejemplo, cloroplasto) también comprende un dominio de unión de cebador (PBD) que una vez dentro del plastidio (por ejemplo, del cloroplasto) es capaz de capturar tARNs como cebadores para formar ARN de plantilla para iniciar la transcripción inversa de la unidad de transformación de cloroplasto planta introducida de la invención. Un tARN adecuado para uso en la presente invención como un cebador es tRNA-fMet que forma un ARN de plantilla listo para transcripción inversa. El experto en la técnica apreciará que los PBD se encuentran naturalmente en retroelementos que incluyen retrovirus y retrotransposones. Los PBD comprenden dominios de ARN específicos que se hibridan con secuencias específicas en las moléculas de tARN. El tARN en sí mismo no sirve como un PBD pero como un cebador para transcripción inversa, la plantilla para la transcripción inversa es la molécula de ARN que lleva un PBD. Se pueden diseñar fácilmente PBD novedosos que se pueden hibridar con otros tARNs. Los PBD se pueden diseñar para unir a otros tipos de tARNs tales como, tRNA-Lys y tRNA-Met de tabaco y otros que son conocidos en la técnica <http://www.unibayreuth.de/departments/biochemie/trna/>).

45 Ciertos elementos de retroelementos tales como retrovirus o retrotransposones, tienen PBD nativos que poseen dominios conservados que se hibridan con los dominios complementarios de tARN (por lo general el tRNA-Met, o tRNA-*trp*); debido a las estructuras conservadas de todos los tARNs (la denominada estructura de hoja de trébol), los PBD se pueden diseñar para que lleven a dominios específicos que se hibridan con un tARN de elección.

50 Una "secuencia de translocación plastidios" (PTS, por ejemplo una secuencia de translocación de cloroplasto (CTS)) es una secuencia de ARN que es capaz de unirse a una proteína de unión de PTS de planta y, por tanto, la PTS y otras secuencias de ARN que se pueden asociar con este o fusionar con el mismo se pueden transportar a través de y en el plastidio (por ejemplo, del cloroplasto). El CTS se puede seleccionar de virus de ARN desnudos, que incluyen los ARN virales tales como aquellos de los virus de ARN de cadena positiva tales como el virus X de papa (PVX), el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del tomate (ToMV), y ARN virales de virus de ARN de cadena negativa, como el virus de tomate silvestre moteado (TSWV) y virus moteado necrótico del impaciente (INSV), viroides tales como viroide latente de mosaico de melocotón (PLMVd) o viroide de mancha solar del aguacate (ASBV), virus satélites tales como virus del mosaico del tabaco de satélite (STMV) y similares. Otras fuentes de las PTS/CTS incluyen ARN del

intrón del grupo I y II o versiones modificadas de los mismos en las que se han eliminado los sitios de corte y empalme crípticos que se pueden derivar de una bacteria, un hongo o un plastidio/cloroplasto de una planta, tal como un intrón de LTRB que carece de la secuencia que codifica la LTRA (proteína codificada por una secuencia de LTRA sea capaz de servir como una proteína de unión PTS/CTS en el método de la invención).

5 Preferiblemente, se han eliminado el intrón es un intrón del grupo II, tal como el intrón LI.LtrB de *Lactococcus lactis* o una versión modificada de la misma en la que los sitios de corte y empalme crípticos como se describe aquí. Los intrones del grupo II ampliamente se representan en los orgánulos de plantas y hongos, y en bacterias. Los intrones del grupo II útiles en el método de la invención son retroelementos móviles, altamente estructurales que codifican proteína multifuncional (proteína codificada de intrón o IEP) que posee actividad transcriptasa inversa (RT). El IEP facilita el empalme de ARN de intrón mediante estabilización de la estructura de ARN catalíticamente activa, realiza la transcripción inversa y la inserción del intrón en los sitios objetivo de ADN específicos del genoma bacteriano a alta frecuencia (Moran et al. (1995) *Mol Cell Biol* 15:2828-2838; Cousineau et al. (1998) *Cell* 94:451-462).

15 Los intrones del grupo II de origen bacteriano, tales como aquellos derivados de *Lactococcus* que comprenden un gen LtrA, se utilizan preferiblemente en el método de la invención. La secuencia de polinucleótidos LtrA de una bacteria *Lactococcus*, tal como *Lactococcus lactis* se puede modificar para la expresión óptima en plantas al insertar en este por lo menos una secuencia de polinucleótido que comprende uno o más intrones de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos de planta, tales como de uno o más genes de planta y al sustituir ciertos codones seleccionados que tienen una baja frecuencia de uso en las plantas nativas con codones que se producen con una mayor frecuencia en dichas plantas. Normalmente, la secuencia de LtrA bacteriana de interés se analiza con referencia a la utilización de codones de planta que utilizan comparaciones *in silico* tales como aquellas encontradas en el sitio web www.kazusa.or.jp/codon para los codones bacterianos que se producen con baja frecuencia en las plantas. Dichos codones luego se pueden sustituir con codones que tienen una alta frecuencia de ocurrencia en las plantas, y se genera una secuencia de polinucleótidos modificada derivada *in silico*. A partir de esta secuencia de LtrA optimizada se elabora una secuencia de polinucleótidos LtrA sintética correspondiente a la secuencia generada *in silico* mediante procedimientos de síntesis de polinucleótidos estándar conocidos en la técnica, y luego se puede utilizar en la preparación de construcciones de uso en la presente invención como se describe aquí. Se considera que al utilizar una secuencia modificada que comprende sustituciones de codones de plantas como se describió anteriormente se generan secuencias de ARN de polinucleótidos más estable en el entorno células vegetales.

20 Otros tipos de intrones que se pueden utilizar en el método de la invención incluyen, por ejemplo, el intrón del grupo I de *Tetrahymena* (GenBank Acc. No.: X54512; Kruger K et al. (1982) *Cell* 31:147-157; Roman J and Woodson S A (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2134-2139), intrones rII del grupo II de *Scenedesmus oblicuo* (No. de Acceso GenBank: nucleótidos 28831-29438 X17375.2; Hollander V y Kuck U (1999) *Nucl Acids Res* 27: 2339-2344; Herdenberger F et al. (1994) *Nucl Acids Res* 22: 2869-2875; Kuck U et al. (1990) *Nucl Acids Res* 18:2691-2697), y el intrón LI.LtrB (No. de Acceso GenBank: nucleótidos U50902 2854 a 5345).

30 Aparte de los intrones heterólogos descritos aquí, los intrones endógenos de origen natural en el plastidio, por ejemplo, en el cloroplasto, tales como intrones del grupo II de los cloroplastos de plantas, por ejemplo el *atpF*, *rpl*, *ARNt*, *trnI*, *trnK*, *petD*, *petB* (Jenkins BD et al., *The Plant Cell*, Vol. 9, 283-296, marzo de 1997).

35 Los intrones que se producen de forma natural en los plastidios, tales como cloroplastos de la planta de interés se pueden modificar de tal manera que tienen una homología de secuencia de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 % o 95%, o de cualquier homología de secuencia entre los mismos porcentajes, con la secuencia del intrón de partida, mientras que conserva la funcionalidad, también se puede emplear en el método de la invención. Otros MTS incluyen dominios de ARN que se encuentran en TNT1, retrotransposones similares de Ty1 y Ty3 de levadura u otro RNA que alberga un dominio que es reconocido por una proteína de unión de ARN que es accionado en los cloroplastos.

40 Una "proteína de unión de secuencia de translocación de plastidios" (PTS-BP, por ejemplo, una CTS-BP) puede ser cualquier proteína de unión de ARN que reconoce y se une a dominios de ARN específicos de interés y se fusiona a un péptido de tránsito de plastidio, tal como un péptido de tránsito de cloroplasto. Ejemplos de proteínas PTS-BP/CTS-BP adecuadas se pueden seleccionar de la proteína Ltra del intrón II LtrB del grupo II, proteínas de cubierta que se unen a los virus de ARN tales como la proteína de la cubierta del virus X de papa (PVX), la proteína de la cubierta de TMV, polimerasas de ARN dependientes de ARN (RdRPs) de los virus de ARN tales como las replicasas de PVX o TMV, proteínas de plantas nativas que son responsables de la translocación del ARN viroide (tal como tiroides PLMVd y ASBV) en los cloroplastos, proteína de transcriptasa inversa de retrotransposones, tal como tabaco TnT1, levadura Tyl-1 que reconocen estructuras en el ARN de molécula de retrotransposón, y proteínas que se unen a los ARN celulares. Preferiblemente, la proteína PTS-BP/proteína CTS-BP es la proteína de la LtrA desde el intrón LtrB del grupo II.

45 Un "péptido de tránsito de cloroplasto de planta" (TP) es uno que se puede derivar u obtener de una proteína dirigida a plastidio, por ejemplo péptido de tránsito de una subunidad pequeña de Rubisco (*rbcS*) o proteínas HSP70 (Marshall & Keegstra (1992) *Plant Physiology*, 100, 1048-1054), y aquellos que se pueden predecir por los programas de secuencias de localización de cloroplasto (<http://www.psort.org>).

La proteína de "transcriptasa inversa", si se emplea, se puede seleccionar de una fuente de retrovirus, tal como de retrovirus de plantas tales como SIRE-1 de soja, o de una fuente retrotransposón tal como el retrotransposón de levadura TY11, por ejemplo el dominio de transcriptasa-RNasa H inversa (Goffeau et al., *Science* 274 (5287), 546-547 (1996)) o el retrotransposón Tnt1 de tabaco (dominio RTRH) (Vernhettes et., al.; *Mol. Biol. Evol.* 15 (7), 827-836 (1998)).

5 Un promotor nuclear de planta (por ejemplo, un promotor específico de núcleo exógeno) es una que es capaz de accionar la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos tal como una secuencia de cADN o una secuencia de genes de longitud completa en el núcleo de una células vegetales, que forma una secuencia de ARN transcrita. El promotor nuclear de planta es uno que se introduce en la parte delantera de una secuencia de ácidos nucleicos de interés y se asocia de forma operable con esta. De esta manera un promotor nuclear de planta es uno que se ha
10 colocado en la parte delantera de un componente de polinucleótido seleccionado. Normalmente, un promotor nuclear de planta, tal como un promotor específico de núcleo exógeno, es uno que se transfiere a una célula anfitriona o planta anfitriona a partir de una fuente diferente de la célula anfitriona o planta anfitriona.

Los cADN que codifican un polinucleótido de la invención contienen por lo menos un tipo de promotor específico de núcleo que es operable en una células vegetales, por ejemplo, un promotor inducible o constitutivo ligado operativamente a una primera y/o segunda secuencia de ácidos nucleicos o componente de secuencia de ácidos nucleicos como se define aquí y según se proporciona por la presente invención. Como se ha discutido, esto permite el control de la expresión de polinucleótidos de la invención. La invención también proporciona plantas transformadas con secuencias de polinucleótidos o construcciones y métodos que incluyen la introducción de dichas secuencias de ácidos nucleicos o polinucleótidos o construcciones en una células vegetales y/o inducción de la expresión de dicha primera o
15 segunda secuencia de ácidos nucleicos o construcción dentro de una células vegetales, por ejemplo, mediante aplicación de un estímulo adecuado, tal como un inductor de exógeno efectivo.

El término "inducible" como se aplica a un promotor es bien conocido por aquellos expertos en la técnica. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible se "activa" o aumenta en respuesta a un estímulo aplicado (que se puede generar dentro de una célula o proporcionar exógenamente). La naturaleza del estímulo varía entre promotores.
25 Algunos promotores inducibles provocan pocos o indetectables niveles de expresión (o ninguna expresión) en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles provocan expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión es en ausencia de estímulo, la expresión de cualquier promotor inducible se incrementa en presencia del estímulo correcto. La situación preferible es cuando el nivel de expresión aumenta después de la aplicación del estímulo pertinente mediante una cantidad efectiva para alterar una característica fenotípica. De esta manera, un promotor inducible (o "activable"), se puede utilizar lo que provoca un nivel básico de expresión en ausencia del estímulo cuyo nivel es demasiado bajo para provocar un fenotipo deseado (y de hecho puede ser cero). Luego de aplicación del estímulo, se incrementa la expresión (o se activa) a un nivel, que lleva al fenotipo deseado. Un ejemplo de un promotor inducible es el interruptor de gen inducible etanol descrito en Caddick et al (1998) *Nature Biotechnology* 16: 177-180. Se conoce una cantidad de promotores inducibles en la técnica.

35 Se pueden utilizar promotores químicamente regulados para modular la expresión de un gen o una secuencia de polinucleótidos de la invención en una planta a través de la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor químicamente inducible, donde la aplicación de los productos químicos induce la expresión del gen, o un promotor químico-reprimible, donde la aplicación del producto químico reprime la expresión génica. Se conocen los promotores químicamente inducibles en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el promotor In2-2 de maíz, que se activa mediante los protectores herbicidas de bencenosulfonamida, el promotor GST del maíz, que se activa por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como preherbicidas emergentes, y el promotor PR-1a del tabaco, que se activa por el ácido salicílico. Otros promotores químicamente regulados de interés incluyen promotores sensibles a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) promotores inducibles por tetraciclina y sensibles a tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, y Patentes Estadounidenses Nos. 5,814,618 y 5,789,156).
40
45

Cuando se desea una expresión mejorada en tejidos particulares, se pueden utilizar promotores específicos de tejido. Los promotores específicos a tejido incluyen aquellos descritos por Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; and Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505.
50

55 Los llamados promotores constitutivos también se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, promotor 35S de CaMV (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); actina de arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 y Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol* 18: 675-689); pEmu (Last et al (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); Promotor ALS (Solicitud Estadounidense No. de Serie 08/409,297), y

similares. Otros promotores constitutivos incluyen aquellos en las patentes Estadounidenses Nos 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; y 5,608,142. En una preferencia, el promotor nuclear de planta utilizado en el método de la invención es un promotor constitutivo.

5 La expresión en el plastidio, tal como en el cloroplasto, se efectúa al emplear un promotor de plastidios vegetales tales como promotores específicos de plastidios y/o elementos de regulación de la transcripción. Ejemplos incluyen el
 10 promotor de ARN de polimerasa (WO 97/06250) y otros promotores descritos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 00/07431, Patente Estadounidense No. 5,877,402, WO 97/06250, WO 98/55595, WO 99/46394, WO 01/42441 y WO 01/07590; el elemento de promotor rpo B, el elemento de promotor atpB, el elemento de promotor clpP (véase también el documento WO 99/46394) y el elemento de promotor 16S rADN. El promotor específico de plastidio
 15 también puede tener un "operón" policistrónico asignado a este (documento EP-A 1 076 095; WO 00/20611). Los promotores que se pueden utilizar en el método de la invención también incluyen el promotor PrbcL, el promotor Prps16, y el promotor Prpn-62, Pycf2-1577, PatpB-289, Prps2-152, Prps16-107, Pycf1-41, Patpl-207, PclpP-511, PclpP-173 y PaccD-129 (WO 97/06250; Hajdukiewicz P T J et al. (1997) EMBO J 16:4041-4048), el promotor PaccD-129 del gen accD de tabaco (WO 97/06250), el promotor PclpP- 53 del gen clpP como promotor NEP altamente activo en
 20 cloroplastos (WO 97/06250), el promotor Prpn-62 del gen rrn, el promotor Prps16-107 del gen rps16, el promotor PatpB/e-290 del gen atpB/e de tabaco (Kapoor S et al. (1997) Plant J. 11: 327-337), y el promotor PrpoB-345 del gen rpoB (Liere K & Maliga P (1999) EMBO J. 18: 249-257). Adicionalmente, todos aquellos promotores que pertenecen a la clase III (Hajdukiewicz P T J et al. (1997) EMBO J 16:4041-4048) y todos los fragmentos de los promotores de clase II que controlan la inicio de la transcripción por NEP se pueden utilizar en el método de la invención. Dichos promotores o
 25 unidades estructurales de promotor en general no se conocen por ser muy conservados. La ATAGAATAAA se da como consenso cerca del sitio de inicio de la transcripción de los promotores NEP (Hajdukiewicz PTJ et al (1997) EMBO J 16: 4041-4048).

Naturalmente, el experto en la técnica apreciará que otras secuencias de ADN terminadoras pueden estar presentes en
 30 las construcciones utilizadas en la invención. Un terminador se contempla como una secuencia de ADN en el extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Estos elementos son secuencias no traducidas 3' que contienen señales de poliadenilación, que actúan para provocar la adición de secuencias de
 35 poliadenilato en el extremo 3' de los transcritos primarios. Para expresión en células vegetales, la secuencia terminadora de transcripción de nopalina sintasa (A. Depicker et al., 1982, J. of Mol. & Applied Gen. 1:561-573) sirve como una señal de terminación de la transcripción.

40 El casete de transgén de plastidio comprende una secuencia de flanqueo izquierda (LFS) y una secuencia de flanqueo derecha (RFS) como se describe aquí, y puede incluir una región promotora y/o una región terminadora procedente de un plastidio de planta superior o inferior, tal como un cloroplasto, por ejemplo, de tabaco, Arabidopsis, Brassica sp.,
 45 papa, maíz (maíz), canola, arroz, trigo, cebada, Brassica sp., algodón, algas (por ejemplo, especies azul verde), lemnochora ("la lenteja de agua"), o musgo (por ejemplo, Physcomitrella patens). Preferiblemente, las regiones de promotor y terminador se obtienen de especies de plantas superiores. Cuando la LFS y RFS no incluyen un promotor y/o una región terminadora, estos componentes se pueden colocar adyacentes a la LFS y/o RFS, según sea apropiado, o puede haber una región espaciadora entre ellas. Se incluye dentro del casete de plastidio por lo menos un transgén o una secuencia de nucleótidos de elección que está destinada a ser transcrita y/o traducida en el cloroplasto de acuerdo con el diseño del método de la presente invención, por ejemplo, para la producción de proteína(s) deseada, ARN de
 50 interés, o inactivos de genes endógenos de plastidios y secuencias reguladoras. Los transgenes adecuados de interés que se contemplan para la producción de proteína o péptido en un método de la presente invención incluyen proteínas de planta y proteínas farmacéuticas para uso en mamíferos, que incluyen el hombre, tal como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como α -interferón, β -interferón, γ -interferón, factores de coagulación de sangre seleccionados de Factor VII, VIII, IX, X, XI, y XII, hormonas de fertilidad, que incluyen la hormona luteinizante, factores de crecimiento de hormona de estimulación de foliculo que incluyen factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos y similares, prolactina, oxitocina, hormona estimulante de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como la β -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, proteína tóxica de insectos de Bacillus thuringiensis; proteína resistente herbicidas (glifosato); proteínas tolerante a sal; proteínas implicadas en conferir esterilidad masculina citoplasmática a las estirpes de fitomejoramiento; proteínas de mejora nutricional implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos, almidones, azúcares, alcaloides, vitaminas y vacunas comestibles, y similares. Adicionalmente, el método de la invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos activos de los mismos y de enzimas industriales.

55 Todas las proteínas mencionadas anteriormente aquí son del tipo de planta y humano. Otras proteínas que se contemplan para la producción en la presente invención incluyen proteínas para uso en el cuidado veterinario, y pueden corresponder a homólogos animales de proteínas humanas, tales como las proteínas humanas mencionadas anteriormente.

60 Naturalmente, el experto en la técnica apreciará que cuando secuencias de ADN terminadoras nucleares estén presentes en las construcciones utilizadas en los métodos de la invención secuencias, estas se contemplan como que comprenden una secuencia de ADN en el extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la

transcripción. Estos elementos son secuencias no traducidas 3' que contienen señales de poliadenilación, que actúan para provocar la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de los transcritos primarios. Para la expresión en células vegetales la secuencia terminadora de transcripción de nopalina sintasa (A. Depicker et al., 1982, J. of Mol. & Applied Gen. 1:561-573) sirve como una señal de terminación de transcripción.

5 Aquellos expertos en la técnica serán capaces de construir vectores y diseñar protocolos para secuencias de ácidos nucleicos recombinantes o expresión de genes. Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión de genes, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Los procedimientos y vectores específicos utilizados previamente con gran éxito en plantas son descritos por Bevan (Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721 (1984)) y Guerinéau y Mullineaux (1993) (Plant transformation and expression vectors. In: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed.) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148).

20 Naturalmente, el experto apreciará que cada transgén introducido en un casete de transgén estará bajo el control regulador de su propio promotor de plastidio exógeno, por ejemplo un promotor y terminador de cloroplasto. Cuando dos o más proteínas objetivo están destinadas a ser producidas a partir de un único ARN portador, es preferible si son capaces de ser separadas fácilmente, por ejemplo al unirse a diferentes anticuerpos específicos de proteínas (monoclonales o policlonales) en la fase de recolección del sistema de cultivo de células vegetales.

25 Los marcadores genéticos seleccionables pueden facilitar la selección de plantas transgénicas y estos pueden consistir de genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a antibióticos tales como la espectinomocina, estreptomocina, kanamicina, neomicina, higromicina, puramicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomocina, imidazolinonas y glifosato.

30 Al introducir secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas de acuerdo con la presente invención en una célula, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones, bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. El ácido nucleico que se va a insertar debe ser ensamblado dentro de una construcción, que contiene elementos reguladores eficaces, que accionarán la transcripción. Debe estar disponible un método para transportar la construcción en la célula. Una vez que la construcción está dentro de la célula, ocurrirá o no ocurrirá la integración en el material cromosómico endógeno. Finalmente, en lo que se refiere a plantas del tipo de célula objetivo debe ser tal que las células se pueden regenerar en plantas completas.

35 Las plantas transformadas con los segmentos de ADN que contienen secuencias de interés que se proporcionan aquí se pueden producir mediante técnicas estándar, que ya son conocidas para la manipulación genética de las plantas. El ADN se puede transformar en células vegetales utilizando cualquier tecnología adecuada, tal como un vector de plásmido Ti desarmado llevado por *Agrobacterium* aprovechando su capacidad de transferencia de genes natural (EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12(22) 8711-87215 1984), bombardeo de partículas o con microproyectiles (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616) microinyección (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green et al. (1987) *Plant Tissue and Cell Cultivo*, Academic Press), electroporación (EP 290395, WO 8706614) otras formas de absorción directa de ADN (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), absorción de ADN mediada por liposoma (por ejemplo, Freeman et al. *Plant Cell Physiol.* 29: 1353 (1984)), o el método de agitación en vórtex (por ejemplo, Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d)). Los métodos físicos para la transformación de células vegetales se revisan en Oard, 1991, *Biotech. Adv.* 9: 1-11.

45 De esta manera, una vez se ha identificado una secuencia de ácidos nucleicos o gen, se puede volver a introducir en células vegetales utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica para producir plantas transgénicas del fenotipo correspondiente.

50 La transformación de *Agrobacterium* es ampliamente utilizada por aquellos expertos en la técnica para transformar especies dicotiledóneas. La producción de plantas transgénicas fértiles estables en casi todas las plantas monocotiledóneas económicamente relevantes también es ahora rutina: (Toriyama, et al (1988) *Bio/Technology* 6, 1072 a 1074; Zhang, et al (1988) *Plant Cell Rep* 7, 379-384; Zhang, et al (1988) *Theor Appl Genet* 76, 835-840; Shimamoto, et al (1989) *Nature* 338, 274-276; Datta, et al (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740; Christou, y otros (1991) *Bio/Technology* 9, 957-962; Peng, et al (1991) *International Rice Research Institute*, Manila, Filipinas 563-574;. Cao, et al (1992.) *Plant Cell Rep* 11, 585-591; Li, et al (1993) *Plant Cell Rep* 12, 250-255; Rathore, et al (1993) *Plant Molecular Biology* 21, 871-884; Fromm, et al. (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm, et al (1990) *Plant Cell* 2, 603-618;. D'Halluin, et al (1992) *Plant Cell* 4, 1495-1505;. Walters, et al (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 189-200; Kozziel, et al (1993) *Biotechnology* 11, 194-200; Vasil, *IK Biología* (1994) *Plant Molecular* 25, 925-937; Semanas, et al. (1993) *Fisiología Vegetal* 102, 1077-1084; Somers, et al. (1992) *Bio/Technology* 10, 1589-1594; WO92/14828). En particular, la transformación mediada por *Agrobacterium* es ahora un método de transformación altamente eficiente alternativo en

monocotiledóneas (Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6, 271-282).

Se ha logrado la generación de plantas transgénicas fértiles en los cereales arroz, maíz, trigo, avena, y cebada (revisado en Shimamoto, K. (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5, 158-162.; Vasil, et al. (1992) *Bio/Technology* 10, 667-674; Vain et al., 1995, *Biotechnology Advances* 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, *Nature Biotechnology* 14 página 702).
 5 Wan y Lemaux (1994) *Plant Physiol.* 104: 37-48 describen técnicas para la generación de grandes cantidades de plantas de cebada fértiles transformadas independientemente.

Se prefieren bombardeo de microproyectiles, electroporación y absorción directa de ADN cuando *Agrobacterium* es ineficiente o inefectivo. Alternativamente, se puede emplear una combinación de diferentes técnicas para mejorar la eficiencia del proceso de transformación, por ejemplo bombardeo con micropartículas recubiertas de *Agrobacterium*
 10 (EP-A-486234) o bombardeo de microproyectil para inducir lesiones seguido por cocultivo con *Agrobacterium* (EP-A-486233).

Después de la transformación, una planta se puede regenerar, por ejemplo a partir de células individuales, tejido de callo o discos de hojas, como es convencional en la técnica. Casi cualquier planta se puede regenerar totalmente a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Las técnicas disponibles son revisadas en Vasil et al., *Cell Cultivo and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I, II y III, *Laboratory Procedures and Their Applications*, Academic Press, 1984, y
 15 Weiss Bach and Weiss Bach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989.

La elección particular de una tecnología de transformación estará determinada por su eficiencia para transformar ciertas especies de plantas, así como la experiencia y preferencia de la persona que practica la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para el experto que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en células vegetales no es esencial para o una limitación de la invención, ni es la elección de la técnica para la regeneración de planta.
 20

El término "heterólogo" se puede utilizar para indicar que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en dichas células de la planta o un antecesor de la misma, utilizando ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. Se puede proporcionar una células vegetales transgénica, es decir, transgénica para la secuencia de nucleótidos en cuestión. El transgén puede estar en un vector extra-genómico o incorporar, preferiblemente de forma estable, en el genoma. Un gen heterólogo puede reemplazar un gen equivalente endógeno, es decir, uno que normalmente realiza la misma o una función similar, o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. Una ventaja de la introducción de un gen heterólogo es la capacidad de colocar la expresión de una secuencia bajo el control de un promotor de elección, con el fin de ser capaz de influir en la expresión de acuerdo con la preferencia. Adicionalmente, se pueden utilizar mutantes, variantes y derivados del gen de tipo silvestre, por ejemplo con actividad superior a aquella del tipo silvestre, en lugar del gen endógeno. Las secuencias de nucleótidos heterólogos o exógenos o extraños, a una células vegetales pueden no ser de origen natural en células de ese tipo, variedad o especie. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos puede incluir una secuencia de codificación de o derivada de un tipo particular de células vegetales o especie o variedad de planta, situada en el contexto de una células vegetales de un tipo o especie o variedad de planta diferente. Una posibilidad adicional es una secuencia de nucleótidos que se coloca dentro de una célula en la que está o se encuentra un homólogo de forma natural, pero en la que la secuencia de nucleótidos está ligada y/o adyacente al ácido nucleico que no se produce naturalmente dentro de la célula, o células de ese tipo o especie o variedad de planta, tal como ligada operablemente a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia promotora, para el control de expresión. Una secuencia dentro de una planta u otra célula anfitriona puede ser de forma identificable heteróloga, exógena o extraña.
 25
 30
 35
 40

También se proporcionan plantas que incluyen una células vegetales transformada mediante un método de acuerdo con la invención, junto con cualquier parte o propágulo de la misma, semilla, progenie autofecundada o híbrida y descendientes. Particularmente se proporcionan plantas de cultivo transgénicas, las cuales se han diseñado para llevar los genes identificados como se ha indicado anteriormente. Ejemplos de plantas adecuadas incluyen tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras especies de *Nicotiana*, zanahoria, verduras y Brassica de semillas oleaginosas, melones, Pimientos, vides de uva, lechuga, fresa, la remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz (maíz), arroz, soja, guisantes, sorgo, girasol, tomate, algodón, y papa. Las plantas transgénicas especialmente preferidas de la invención incluyen algodón, arroz, especies de Brassica de semillas oleaginosas tales como canola, maíz (maíz) y soja.
 45

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie y descendientes autofecundados o híbridos, y cualquier parte de cualquiera de estos, tales como esquejes, semillas. La invención proporciona cualquier propágulo de planta que es cualquier parte que se puede utilizar en la reproducción o propagación, sexual o asexual, que incluye esquejes, semillas, etcétera. También se abarca por la invención una planta que tiene una descendencia propagada sexual o asexualmente, clon o descendiente de dicha planta, o cualquier parte o propágulo de dicha planta, descendencia, clon o descendiente.
 50

La presente invención también abarca el producto de expresión del polipéptido de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención como se describe aquí u obtenible de acuerdo con la información y sugerencias aquí. También se proporcionan métodos de fabricación de dicho producto de expresión mediante la expresión de una secuencia de
 55

nucleótidos que por lo tanto se codifica bajo condiciones adecuadas en células anfitrionas adecuadas, por ejemplo E. coli. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de construir vectores y diseñar protocolos y sistemas para la expresión y recuperación de productos de expresión de genes recombinantes.

5 La proteína objetivo heteróloga o exógena se contempla por ser cualquier proteína de interés que se puede producir por el método de la invención.

Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede ser un alelo, variante, fragmento, derivado, mutante u homólogo de los polipéptidos como se menciona aquí. El alelo, variante, fragmento, homólogo derivado, mutante o sustancialmente puede tener la misma función de los polipéptidos aludida anteriormente y como se muestra aquí o puede ser un mutante funcional del mismo.

10 “Homología”, en relación a una secuencia de secuencia de aminoácidos o polipéptidos producida por el método de la invención se puede utilizar para referirse a identidad o similitud, preferiblemente identidad. Como se observó ya anteriormente, se puede limitar el alto nivel de identidad de aminoácidos a dominios o regiones funcionalmente significativas.

15 En ciertas realizaciones, un alelo, variante, derivado, derivado mutante, mutante u homólogo de la secuencia específica puede mostrar poca homología general, digamos aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40% o aproximadamente 45%, con la secuencia específica. Sin embargo, en dominios o regiones funcionalmente significativos, la homología de aminoácidos puede ser mucho mayor. Se pueden identificar dominios o regiones significativos funcionalmente putativos mediante procesos de bioinformática, que incluyen la comparación de las secuencias de homólogos.

20 Los dominios o regiones de diferentes polipéptidos funcionalmente importantes se pueden combinar para expresión del ácido nucleico de codificación como una proteína de fusión. Por ejemplo, las propiedades particularmente ventajosas o deseables de diferentes homólogos se pueden combinar en una proteína híbrida, de tal manera que el producto de expresión resultante, puede incluir fragmentos de diversas proteínas progenitoras, si es apropiado.

25 La similitud de las secuencias de aminoácidos puede ser como se define y determina por el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que es de uso estándar en la técnica. En particular, se puede utilizar TBLASTN 2.0 con Matrix BLOSUM62 y penalizaciones por hueco: existencia: 11, extensión: 1. Otro programa estándar que se puede usar es BestFit, que es parte del Paquete de Wisconsin, Versión 8, septiembre de 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711). BestFit hace un alineamiento óptimo del mejor segmento de similitud entre dos secuencias. Los alineamientos óptimos se encuentran al insertar huecos para maximizar el número de coincidencias utilizando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489). Otros algoritmos incluyen GAP, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximizan el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Como con cualquier algoritmo, generalmente se utilizan parámetros predeterminados, para los cuales el GAP es una penalización por creación de hueco = 12 y penalización de extensión de hueco = 4. Alternativamente, se puede utilizar una penalización por creación de hueco de 3 y la penalización por extensión de hueco de 0.1. El algoritmo FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS EE.UU. 85: 2444-2448) es una alternativa adicional.

35 El uso de cualquiera de los términos “homología” y “homólogo” aquí no implica ninguna relación evolutiva necesaria entre secuencias comparadas, en mantenimiento, por ejemplo con el uso estándar de términos tales como “recombinación homóloga”, que requiere simplemente que dos secuencias de nucleótidos sean suficientemente similares para recombinarse en las condiciones apropiadas. Se encuentra a continuación la discusión adicional de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, que se puede codificar por el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

Ahora se siguen los ejemplos no limitantes y las figuras que ilustran la invención.

Figuras

45 Figura 1: los principales componentes del sistema de transformación de cloroplasto.

(1) El vector de transformación contiene (i) la secuencia de translocación de cloroplasto (CTS); (ii) casete de transgén de cloroplasto que comprende la secuencia de flanqueo izquierda (LFS) y secuencia de flanqueo derecha (RFS) para facilitar la inserción del casete en el genoma del cloroplasto utilizando recombinación homóloga, región promotora del gen *rrn16* de cloroplasto de tabaco (Prn), el gen *aadA* como marcador seleccionable (*aadA*), terminador de transcripción del genoma de cloroplasto (term); y (iii) dominio de unión de cebador (PBD). (2) el gen de la transcriptasa RNasa H inversa translacionalmente fusionada al péptido de tránsito de cloroplasto de la subunidad pequeña de gen Rubisco de tabaco (GR-CTP). (3) Péptido de unión a CTS traslacionalmente fusionado al péptido de tránsito del cloroplasto del gen *Hsp60* de Arabidopsis (*Hsp60-CTP*).

Figura 2: grupo de construcciones utilizadas para la transformación de cloroplasto en tabaco (ALG298, ALG327 y ALG344) y en Arabidopsis (ALG347 y ALG327)

El casete de transformación de cloroplasto contiene secuencias de flanqueo izquierda y derecha (LFS y RFS), promotor Prn (Prn), gen aadA para la selección de espectinomicina (aadA), y terminador de transcripción rrnB (rrnB ter). El dominio de unión del cebador (PBD) del retrotransposón de levadura Ty1 diseñado para capturar tRNA-Met de los cloroplastos se fusionó al casete de transgén de cloroplasto. El casete resultante se insertó dentro del dominio IV del intrón LtrB (LtrB5' y LtrB3') de Lactococcus lactis (ALG298 y ALG347) o se fusionó a la secuencia de translocación de cloroplasto del viroide de mancha solar del aguacate (ASB-CTS en ALG344). El casete del transgén de cloroplasto se expresó a partir del casete insertado nuclear y el ARN resultante se translocó en el cloroplasto utilizando la proteína LtrA para los vectores (ALG298 y ALG347), o utilizando las proteínas de plantas nativas para el vector ALG344. La transcripción inversa del ARN se realizó mediante transcriptasa-RNasaH inversa fusionada a péptido de tránsito de cloroplasto (cTP-RTRH) del gen Hsp60 (ALG327). El promotor Ubiq3 Pro-Arabidopsis del gen de ubiquitina 3; Promotor 35S Pro del gen del virus mosaico de coliflor 35S, promotor TAF2 Pro-Arabidopsis del gen TAF 2; terminador de transcripción del gen nos de Agrobacterium.

Figura 3: se realizaron modificaciones del casete de transformación del cloroplasto al diseñar el dominio de unión a cebador y posicionar los elementos fundamentales del casete del transgén.

CTU- unidad de transformación de cloroplasto; CTS-5' Secuencia de translocación de cloroplasto localizada en el extremo 5' del casete de transformación; CTS-3' secuencia de translocación de cloroplasto localizada en el extremo 3' del casete de transformación; PDB-CHL- Dominio de unión a cebador diseñado para la transcripción inversa en los cloroplastos utilizando tRNA-Met de cloroplastos; PBD-CYT- Dominio de unión de cebador diseñado para la transcripción inversa en el citoplasma utilizando tRNA-Met citoplasmático.

Las modificaciones detalladas en la sección 1B de Ejemplos en adelante y que corresponde a las figuras incluyen una primera modificación del uso de PBD para la unión de tRNA-Met citoplásmico como cebador [Figura 3 (C)]. Como segunda modificación la CTS se puede situar en los extremos 5' y 3' del casete de transformación tal como en el caso con el intrón LtrB. El casete de transgén se inserta en el interior del intrón LtrB (dominio IV). El PDB-CHL se ubica en dirección 3' del extremo 3' LtrB del casete (CTS-3'), de tal manera que la proteína LtrA es capaz de funcionar como una proteína de translocación y transcriptasa inversa. La proteína LtrA tiene tres funciones principales: (1) como una maturasa (se une a ARN LtrB y estabiliza la estructura secundaria del ARN, y ayuda a corte y empalme); (2) como una endonucleasa (induce rupturas de ADN de cadena sencilla en el sitio objetivo); y (3) como una transcriptasa inversa (que realiza transcripción inversa del ARN del intrón después de la inserción del ARN de intrón LtrB en el sitio donante).

La proteína LtrA es incapaz de realizar la reacción de transcripción inversa de manera eficiente si el PBD-CYT se ubica adyacente a, y en frente de una secuencia de translocación de cloroplastos en el extremo 3' de la CTU (CTS-3') como en la figura 3 (B), pero puede transcribir de forma inversa eficientemente el ARN si el PBD se ubica en dirección 3' de una secuencia de translocación de cloroplastos (CTS- 3') como se muestra en la figura 3A. Dicho posicionamiento o la combinación de los componentes del casete de transformación como se muestra en la figura 3 (A) permite la translocación de la CTU en el cloroplasto y la transcripción inversa de la CTU mediante la proteína LtrA. Por lo tanto, al posicionar los componentes de CTS y de PBD-CHL como se muestra en la figura 3 (A) el procedimiento de transformación se simplifica ya que no hay ningún requisito para cosuministrar otro gen para proporcionar una función de transcriptasa inversa.

Se consigue una simplificación similar del procedimiento si se utiliza un PBD-CYT, ya que existe una cantidad significativa de transcriptasa inversa endógena nativa en el citoplasma, y la transcripción se inicia por la transcriptasa inversa endógena utilizando tRNA-Met citoplásmico inverso. Esto también elimina la necesidad del cosuministro de otro gen para transcripción inversa en los cloroplastos.

El caso de la figura 1A y B se atribuye al intrón LtrB, el caso en la figura 1C se atribuye a ASB-CTS.

Figura 4: presentación esquemática de las construcciones basadas en el LtrB-CTS para transformación de cloroplastos en tabaco.

Nos ter terminador de transcripción nos, LtrB3 extremo cebador 3' del intrón LtrB, PBD-CHL- dominio de unión de cebador para cloroplasto tRNA-Met, PDB- CYT- dominio de unión de cebador para tRNA-Met citoplasmático, trnA flanco- flanco izquierdo del casete de transgén, psbA ter- terminador de transcripción del cloroplasto del tabaco, gen mGFP- mGFP4, aadA- gen aadA, Trn- promotor del cloroplasto rrn16 del tabaco, trnI flanco- flanco derecho del casete del transgén, LtrB5- extremo de cebador 5' del intrón LtrB, 35S Pro- promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), TAF2 Pro-promotor de gen TAF2 de Arabidopsis, CTP- péptido de tránsito del cloroplasto del gen rbcS de tabaco, LtrA- gen codificado por el marco de lectura abierto del intrón LtrB, ags ter- terminador de transcripción del gen ags.

Figura 5: Presentación esquemática de construcciones basadas en LtrB-CTS para transformación de cloroplastos en el arroz.

5 Nos ter- terminador de transcripción nos, LtrB3- extremo de cebador 3' del intrón LtrB, PBD-CHL- dominio de unión de cebador para cloroplasto tRNA-Met, PDB-CYT- dominio de unión de cebador para tRNA-Met citoplasmático, trnA flanco- flanco izquierdo del casete de transgén, AtpA ter- terminador de transcripción de cloroplasto del trigo, mGFP- gen mGFP4, aadA- gen aadA, Wrrn- promotor del cloroplasto rrn16 de trigo, trnI flanco- flanco derecho del casete del transgén, LtrB5- extremo de cebador 5' de intrón LtrB, 35S Pro- promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), Act1 Pro- promotor del gen actina 1 del arroz, cTP- péptido de tránsito del cloroplasto del gen rbcS de tabaco, LtrA- gen codificado por el marco de lectura abierto del intrón LtrB, ags ter- terminador de transcripción del gen ags.

10 Figura 6: Presentación esquemática de las construcciones basadas en ASB-CTS para la transformación de cloroplastos en el tabaco.

15 Nos ter- terminador de transcripción nos, ASB- secuencia de viroide de mancha solar del aguacate (ASBVd) como CTS, PBD-CHL- dominio de unión de cebador para cloroplasto tRNA-Met, PDB- CYT- dominio de unión de cebador para tRNA-Met citoplasmático, trnA flanco- flanco izquierdo del casete del transgén, psbA ter- terminador de transcripción de cloroplasto del tabaco, mGFP- gen mGFP4, aadA- gen aadA, Trrn- promotor de cloroplasto rrn16 del tabaco, trnI flanco- flanco derecho del casete de transgén, 35S Pro- promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV) , TAF2 Pro- promotor de gen TAF2 de Arabidopsis, cTP- péptido de tránsito de cloroplasto del gen rbcS del tabaco, RT-Ty1- gen de transcriptasa inversa del retrotransposón de levadura Ty1, ags ter- terminador de la transcripción de gen ags.

20 Figura 7: Amplificación por PCR de unión de flanqueo izquierdo en el tabaco transformado por los vectores basados en LtrB-CTS.

M- ADN marcador, 1-6- estirpes transgénicas independientes, wt- tabaco no transgénico, NC- control negativo sin ADN.

Figura 8: Hibridación Southern para tabaco transformado con vectores basados en ASB-CTS y CTS-LtrB.

25 El tamaño esperado de la banda de ADN de tipo silvestre es ~1.3 kb, y la banda con la inserción del transgén ~3.6 kb. Se utilizó sonda de cloroplasto en dirección 5' de LFS como una sonda. M- ADN marcador, wt- ADN de la estirpe no transgénica, 1-3- estirpes ASB-CTS, 4-8- estirpes transgénicas LtrB-CTS.

Figura 9: Análisis Northern para plantas de tabaco transformadas con vector basado en LtrB-CTS.

Se utilizó la sonda de ADN aad-GFP para la hibridación. El tamaño esperado de la banda es -1.5 kb. Carril 1- ARN de plantas transformadas con casete35S-aadA-GFP-nos; carril 2- ARN WT; carriles 3-8- estirpes transgénicas independientes.

30 SECCIÓN EXPERIMENTAL 1A

Un método novedoso para transformación de cloroplastos eficiente

35 Un nuevo método para la transformación de cloroplastos en plantas comprende (1) un vector de transformación que consiste en 3 dominios principales: (i) secuencia de translocación de cloroplasto (CTS), (ii) casete de transgén de cloroplastos, (iii) dominio de unión de cebador (PBD), que utiliza cloroplasto tRNA-fMet o cualquier otro cloroplasto tARNs como un cebador para transcripción inversa;

(2) Transcriptasa- RNasa H inversa (RT-RH) del retrotransposón o retrovirus fusionados al péptido de tránsito de cloroplasto para orientación en los cloroplastos;

(3) proteína de unión a RNA que se une a la secuencia de translocación de cloroplastos (CTS) del vector de transformación, fusionado al péptido de tránsito al cloroplasto (Figura 1).

40 Fundamento de Tecnología

El proceso de transformación de cloroplastos comprende dos etapas:

(1) la orientación del complejo de ARN-proteína a los cloroplastos.

45 Después del suministro de la construcción de transformación de cloroplastos en la células vegetales una fuerte expresión del ARN que contiene el casete de transgén de la secuencia de translocación de cloroplasto (CTS) y el dominio de unión de cebador (PBD) se consigue del promotor específico nuclear. La proteína de unión de CTS (CTS-

BP) fusionada a un péptido de tránsito de cloroplasto, también será sobre-expresada en cosuministro de la misma o de un vector diferente y luego se unirá al CTS, y facilitará la translocación del ARN en los cloroplastos.

5 Una vez que el vector de transformación del cloroplasto se presenta en la células vegetales a través de transformación nuclear, el cloroplasto entonces será bombardeado de forma permanente por el complejo CTS-BP-ARN expresado. Dicho bombeo estable y continuo del complejo en el orgánulo objetivo es un requisito previo para lograr una alta eficiencia de transformación de orgánulo. La tecnología explota el descubrimiento de que la secuencia de tránsito de cloroplastos es suficiente para permitir que el complejo CTS-BP-ARN completo luego se tome por el cloroplasto.

10 La secuencia de translocación cloroplastos (CTS) se puede seleccionar de una serie de secuencias de ARN tal como el ARN viroide, intrón de ARN del grupo I y grupo II, grupo que son reconocidos por las proteínas nativas correspondientes de unión de ARN.

(2) Transcripción inversa del casete del transgén e inserción en el genoma del cloroplasto.

15 Una vez que el ARN del vector de transformación está dentro del orgánulo, el dominio de unión de cebador (PBD) del ARN de vector captura tRNA-fMet como cebador, y la sobreexpresión de la transcriptasa inversa (RT-RH) fusionada al péptido de tránsito de cloroplasto facilita la transcripción inversa del ARN en ADN de cadena sencilla. Esto es seguido por la inserción del casete de transcripción inversa en el genoma de cloroplasto utilizando recombinación homóloga entre las secuencias de flaqueo del casete de transgén y las regiones homólogas en el genoma del cloroplasto.

Se diseña el dominio de unión a cebador (PBD) para capturar la proteína RT-RH y el cloroplasto tRNA-fMet (u otro cloroplasto tARNs) como cebador, e iniciar la transcripción inversa del ARN del casete de transgén de cloroplasto en un ADN de cadena sencilla.

20 Una vez que se ha transformado la población de genomas de orgánulos en la estirpe de planta inicial, los transgenes codificados nucleares ya no son necesarios y luego se pueden eliminar a través de la segregación en generaciones subsiguientes de plantas, dejando una estirpe de plantas transformada de orgánulos limpia.

Materiales y Métodos

Preparación de la secuencia de translocación de cloroplastos (CTS) con base en intrón del Grupo II

25 Se sintetizó el intrón LtrB de *Lactococcus lactis* por el proveedor de síntesis de ADN comercial. Los sitios potenciales de corte y empalme se eliminaron de esta secuencia como se describe en nuestra patente anterior. El dominio de inserción de casete del transgén (sitios AscI-MluI-NotI) está subrayado y se muestra en negrita.

Secuencia de intrón LtrB

GGATCCCTCGAGGTGCGCCAGATAGGGTGTAAAGTCAAGTAGTTAAGGTACTACTCAGTAAGAT
AACACTGAAAACAGCCAACCTAACCGAAAAGCGAAAGCTGATACGGGAACAGAGCACGGTTGGAAA
GCGATGAGTTAGCTAAAGACAATCGGCTACGACTGAGTCGCAATGTTAATCAGATATAAGCTATAA
GTTGTGTTTACTGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATGTGTCGATAGAGGAAAGTGTCTGAAACC
TCTAGTACAAAGAAAGCTAAGTTATGGTTGTGGACTTAGCTGTTATCACCACATTTGTACAATCTG
TTGGAGAACCAATGGGAACGAAACGAAAGCGATGGCGAGAATCTGAATTTACCAAGACTTAACACT
AACTGGGGATAGCCTAAACAAGAAATGCCTAATAGAAAGGAGGAAAAAGGCTATAGCACTAGAGCTT
GAAAATCTTGCAAGGCTACGGAGTAGTCGTAGTAGTCTGAGAAGGCTAACGGCCTTTACATGGCAA
AGGGCTACAGTTATTGTGTACTAAAATTAATAATGATTAGGGAGGAAAACCTCAAATGAAACCA
ACAATGGCAATTTTAGAAAGAATCAGTAAAAATTCACAAGAAAATATAGACGAAGTTTTTACAAGA
CTTTATCGTTATCTTTTACGTCCTGATATTTATTACGTGGCGGGCGCGCCACGCGTGCGGCCGCTG
GGAAATGGCAATGATAGCGAAAGAACCTAAACTCTGGTTCTATGCTTTCATTGTCATCGTCACGT
GATTCATAAACACAAGTGAATTTTACGAACGAACAATAACAGAGCCGTATACTCCGAGAGGGGTA
CGTACGGTTCCCGAAGAGGGTGGTGCAAACCAGTCACAGTAATGTGAACAAGGCGGTACCTCCCTA
CTTACCATATCATTTTTAATTCTACGAATCTTTATACTGGCAAACAATTTGACTG

SEQ ID NO.1

La secuencia de translocación de (CTL) del viroide de mancha solar de aguacate (No. de Acceso Bank J02020) se sintetizó por PCR utilizando el grupo de los siguientes cebadores superpuestos:

- AS839** GAACTAATTTTTTAATAAAAGTTCACCACGACTCCTCCTTCTCTCACAA
SEQ ID NO.2
- AS840** TAAAAAATTAGTTCACTCGTCTTCAATCTCTTGATCACTTCGTCTCTTC
SEQ ID NO.3
- AS841** TGCGAGACTCATCAGTGTTCTTCCCATCTTCCCTGAAGAGACGAAGTGA
SEQ ID NO.4
- AS842** CTGATGAGTCTCGCAAGGTTTACTCCTCTATCTTCATTGTTTTTTACAA
SEQ ID NO.5
- AS843** GGGCGCGCCAAGATTTTGTAAAAAACAATGAAGA SEQ ID NO.6
- AS844** GCTCGAGACTTGTGAGAGAAGGAGGAGTC SEQ ID NO.7

5

La secuencia CTL de viroide de mancha solar de aguacate

GCTCGAGACTTGTGAGAGAAGGAGGAGTCGTGGTGAACTTTTATTAAAAAATTAGTTCACTCGTC
TTCAATCTCTTGATCACTTCGTCTCTTCAGGGAAAGATGGGAAGAACACTGATGAGTCTCGCAAGG
TTTACTCCTCTATCTTCATTGTTTTTTTACAAAATCTTGGGCGCGCCC SEQ ID NO.8

La expresión de la secuencia de translocación de cloroplastos y el casete de cloroplasto fusionado a este que fue accionado por el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor obtenido mediante síntesis de ADN

10 Secuencia de promotor 35S

CAATCCCACAAAAATCTGAGCTTAACAGCACAGTTGCTCCTCTCAGAGCAGAATCGGGTATTCAAC
 ACCCTCATATCAACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCACATGCCGGTATATACGATGACTGGGGTT
 GTACAAAGGCGGCAACAAACGGCGTCCCGGAGTTGCACACAAGAAATTTGCCACTATTACAGAGG
 CAAGAGCAGCAGCTGACGCGTACACAACAAGTCAGCAAACAGACAGGTTGAACTTCATCCCCAAG
 GAGAAGCTCAACTCAAGCCCAAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACAAAGCCACCAAAGCAAAAAGCCC
 ACTGGCTCACGCTAGGAACCAAAAAGGCCAGCAGTGATCCAGCCCCAAAAGAGATCTCCTTTGCC
 CGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTTTACGATCTAGGAAGGAAGTTCGAAGGTGAAGTAG
 ACGACACTATGTTCAACTGATAATGAGAAGGTTAGCCTCTTCAATTCAGAAAGAATGCTGACC
 CACAGATGGTTAGAGAGGCCCTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGTAACAATCTCC
 AGGAGATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTCAGGACTAATGTCATCA
 AGAACACAGAGAAAAGACATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCT
 TGCTTCATAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAGGTAGTTCCTACTGAATCTA
 AGGCCATGCATGGAGTCTAAGATTCAAATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGTGAAGACTGGCGAA
 CAGTTCATACAGAGTCTTTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC
 GACTCTGGTCTACTCCAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACT
 TTTCAACAAAGGATAATTTGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATC
 GAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATC
 ATTCAGATCTCTCTGCCGACAGTGCTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAA
 AAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGG
 GATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTG
 GAGAGGACACG SEQ ID NO.9

5 El casete de transgén de cloroplastos contiene secuencias de flanqueo izquierda y derecha (LFS y RFS) para inserción del casete entero en el genoma del cloroplasto utilizando recombinación homóloga, región de promotor Prn16 de tabaco, el gen aadA como un marcador seleccionable, y la secuencia de 3'UTR del gen psbA como terminador de transcripción (Figura 1).

Se amplificaron las secuencias LFS para el tabaco y Arabidopsis utilizando los siguientes cebadores de PCR:

AS699 GGC GCG CCG TGGG ATCC GGG CCG TCCG SEQ ID NO.10
AS700 GGC ATG CTGG CCG AGCT GGG CCA TCC SEQ ID NO.11

10 Secuencia LFS de Tabaco

GGCGCGCCATGGGATCCGGGCGGTCCGGGGGGGACCACCACGGCTCCTCTCTTCTCGAGAATCCAT
ACATCCCTTATCAGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAGCAATGGGAAAATAAAATG
GAGCACCTAACAAACGCATCTTACAGACCAAGAACTACGAGATCGCCCCTTTCATCTGGGGTGAC
GGAGGGATCGTACCATTTCGAGCCGTTTTTTTTCTTGACTCGAAATGGGAGCAGGTTTGAAAAAGGAT
CTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAACGCCTTCTTTTTTCTTCTCATCGGAGTT
ATTTACAAAGACTTGCCAGGGTAAGGAAGAAGGGGGGAACAAGCACACTTGGAGAGCGCAGTACA
ACGGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCCGAAAAGGAATCTATTGATTCTCT
CCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTCACGGGCGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGG
ATGGCCGCATGCC

SEQ ID NO.12

Secuencia de LFS Arabidopsis

GGCGCGCCGTGGGATCCGGGCGGTCCGGAGGGGACCCTATGGCTCCTCTCTTCTCGAGAATCCAT
ACATCCCTTATCAGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCGCAGGTTTAGGTTCCGGCCTCAATGGGAA
AATAAAATGGAGCACCTAACAAACGTATCTTACAGACCAAGAACTACGAGATCACCCCTTTCATTC
TGGGGTGACGGAGGGATCGTACCGTTCGAGCCTTTTTTTCATGTTATCTATCTCTTGACTCGAAAT
GGGAGCAGGTTTGAAAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTAGGCCAGTAGGGTCTCTTAACGCCCT
CTTTTTTCTTCTCATCGAAGTTATTTACAAATACTTCCCTATGGTAACGAAGAGGGGGGAACAAG
CACACTTGGAGAGCGCAGTACAACGGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCCG
AAAAGGAATCTATTGATTCTCTCCCAATTGGTTGGACCATAGGTGCGATGATTTACTTCACGGGCG
AGGTCTCTGGTTCAAATCCAGGATGGCCCAGCTGCGCCAGCATGC

SEQ ID NO.13

5

Se amplificaron las secuencias RFS utilizando los siguientes cebadores de PCR:

AS764	TGATATCGGATGGCCCTGCTGCGCCAGGGAAAAGAAT	SEQ ID NO.14
AS845	GCCGCGGATTGCCCTTCTCCGACCCTGAC	SEQ ID NO.15

Secuencia RFS de Tabaco

GATATCGGATGGCCCTGCTGCGCCAGGGAAAAGAATAGAAGAAGCATCTGACTACTTCATGCATGC
 TCCACTTGGCTCGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAGAGCTCCGCTCTTGCAATTGGGTCGTTGCGA
 TTACGGGTTGGATGTCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTACCTGAACCGGTGGCTCA
 CTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACGTGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGATG
 GGCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCAGTTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGA
 CGGTAGTTGGAGTCGGCGGCTCTCCAGGGTTCCCTCATCTGAGATCTCTGGGGAAGAGGATCAAG
 TTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCACTATCTCCCTTCAACCCTTTGAGCGAAATGCGGCAAAGA
 AAAGGAAGGAAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCACCCGTTAGGAACTACGAGATCACCCCA
 AGGACGCCTTCGGCATCCAGGGGTCACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATAAGTGGAAACGCAT
 TAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGCAGTCAGGGTCGGAGAAGGGCAATCCGCGG

SEQ ID NO.16

Secuencia RFS de Arabidopsis

GATATCGGATGGCCCTGCTGCGCCAAGGAAAAGAATATAAGAAGGATCTGACTCCTTCATGCATGC
 TCCACTTGGCTCGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAGAGCTCCGCTCTTGCAATTGGGTCGTTGCGAT
 TACGGGTTGGGTGTCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTACCTGAACCGGTGGCTCAC
 TTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACATGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGATGG
 GCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGTCAGTTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGAC
 GGTAGTTGGAGTCGGCGGCTCTCCTAGGGTTCCCTCGTCTGGGATTGATCCCTGGGGAAGAGGATC
 AAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCACTATCTCCCTTCAACCCTTTGAGCGAAATGCGGCAA
 AGGAAGGAAAATCCATGGACCGACCCCATCGTCTCCACCCGTTAGGAACTACGAGATCACCCCAAG
 GACGCCTTCGGTATCCAGGGGTCGCGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATAAGTGGAAATGCATTA
 GCTGTCCGCTCGCAGGTTGGGCAGTAAGGGTCGGAGAAGGGCAATCCGCGG

SEQ ID NO.17

- 5 El promotor Prn se amplificó del ADN genómico de tabaco cv. Petite Gerard utilizando los siguientes cebadores de PCR:

AS750 GGCATGCCGCAATGTGAGTTTTGTAGTTG SEQ ID NO.18
Prn-R ACTTGATCGATGCGCTTCATATTCGCCGGA SEQ ID NO.19

Secuencia promotora Prn16

GCATGCCGCAATGTGAGTTTTGTAGTTGGATTTGCTCCCCGCGTCGTTCAATGAGAATGGATA
 AGAGGCTCGTGGGATTGACGTGAGGGGGCAGGGATGGCTATATTTCTGGGAGCGAACTCCGGGCGA
 ATATGAAGCGCATCGATACAAGT

SEQ ID NO.20

10

el gen aadA se sintetizó por el proveedor de síntesis de ADN comercial. Tres intrones de genes de At2g29890 Arabidopsis se insertaron en la secuencia de codificación para optimizar la expresión de la aadA en el citoplasma de las células vegetales. Los intrones están subrayados y aparecen en negrita.

Secuencia del gen aadA

ATGGCAGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAAGTAACTTTTAGCTCTCA
GCTGCTGTTACTAAGTTCATGCCATACATTGATTCTGGTTTATTAAGGGTTATGTTTCACTATTAC
TAGTAACAAATCTATTTCTTCGTTTCCGCTCTGCAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAA
 CCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGAT
 ATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGAC
 CTTTTGGAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAGGTAATTTTCATC
TTTGGTTGGCCTTCCAAGTGCTTTTTTTGCTGTTTACGGGTGGAACTTCACTAAAAATGGGATCAA
AACATCATATGGCATAAATAAATTTAAGAATGGCGAACTCGGGGTTACCGAATATGGCTTCCTTT
TTCAGTGTTCCTTAGTCCATTGTACTTATGAGATTGCAGGTACCATTGTTGTGCACGACGACATC
 ATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTT
 GCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAA
 CATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTA
 TTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCAGGTAAGAAATCT
TTTCCCATCTTGAAGTCACTCAAACCGAACGTTAGGAAATTCAAAATGTTTTGATAGTAGTCTA
CTTAGTTTCAAGTTTTGGGTTTGTGTATACTTCACTAATAATATGCGTGGAACATTGCAGGTGA
 TGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAATCGCGCC
 GAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGA
 AGCTAGACAGGCTTATCTTGGAACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGA
 ATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAA

SEQ ID NO.21

El terminador psbA 3'UTR se amplificó a partir del ADN del tabaco genómico cv Petite Gerard utilizando los siguientes cebadores:

AS749 GGATATCAAACAAATACAAAATCAAATAGA SEQ ID NO.22
AS778 GGAATTCTGAGCGCGCTAGAGCGATCCTG SEQ ID NO.23

5

Secuencia psbA 3'UTR del cebador

GAATTCTGAGCGCGCTAGAGCGATCCTGGCCTAGTCTATAGGAGGTTTTGAAAAGAAAGGAGCAAT
 AATCATTTTTCTTGTCTATCAAGAGGGTGCTATTGCTCCTTTCTTTTTTTCTTTTTATTTATTAC
 TAGTATTTTACTTACATAGACTTTTTTGTTTACATTATAGAAAAGAAGGAGAGGTTATTTTCTTG
 CATTATTTCATGATTGAGTATTCTATTTTGATTTTGTATTTGTTTGATAT SEQ ID NO.24

10 Se diseñó el dominio de unión de cebador (PBD) como se describe por Friant et al., ((1998) Mol. Cellul. Biology, 18: 799-806) y se amplificó mediante PCR utilizando el siguiente grupo de cebadores superpuestos:

AS830 CCGCGGTATCTCACATTCACCCAATTGTCATGGT SEQ ID NO.25
AS831 TTAGAAGTATCCTGTGCACATCCGCAACCATGACAATTGG SEQ ID NO.26
AS832 ACAGGATACTTCTAAGGAAGTCCACACAAATCAAGAACCCTAGA SEQ ID NO.27
AS833 TCACATTCTTCTGTTTTGGTAGCTGAAACGTCTAAGGGTCTTGA SEQ ID NO.28

AS834 ACAGAAGAATGTGAGAAGGCTTCCACTAAGGCTAACTCTCAACAG SEQ ID NO.29
AS835 CGCGGCCGCGTTGTCTGTTGAGAGTTAGC SEQ ID NO.30

Secuencia PBD

CCGCGGTATCTCACATTCACCCAATTGTCATGGTTGCGGATGTGCACAGGATACTTCTAAGGAAGT
CCACACAAATCAAGAACCCTTAGACGTTTCAGCTACCAAAACAGAAGAATGTGAGAAGGCTTCCAC
TAAGGCTAACTCTCAACAGACAACGCGGCCGC SEQ ID NO.31

- 5 El gen LtrA de *Lactococcus lactis* codificado por el intrón LtrB se sintetizó por el proveedor de síntesis de ADN comercial. La secuencia de la proteína LtrA primero se optimizó para el uso de codones en las plantas y 5 intrones de plantas se insertaron en la secuencia de codificación para mejorar la expresión LtrA en las plantas. Los intrones de plantas insertados en la secuencia de codificación del gen LtrA están subrayados y se muestran en negrita. Los intrones 1,2 4 son del gen At5g01290 de *Arabidopsis*, el intrón 3 y 5 se seleccionaron de los genes At5g43940de *Arabidopsis*. El clon fue nombrado como LtrASi.
- 10

Secuencia de gen LtrASi:

GCATGCATGAAGCCAACAATGGCAATCCTCGAACGAATCTCTAAGAACTCACAGGAGAACATCGAC
GAGGTACAATAACCCATATATATGAATTGATTCATGTGTTACTCGTACTTGTTTGAATATGTTGG
AGCAAGTTTGATACTTTTGGATGATGATATCGCAAATTCGTTATCTTTTTGGCGTTATAGGTCTTC
ACAAGACTTTACCGTTACCTTCTCCGTCTGACATCTACTACGTGGCATATCAGAACCCTACTCT
ACAAGGGAGCTTCTACAAAGGGAATCCTCGATGATACAGCTGATGGATTCTCTGAGGAGAAGATC
AAGAAGATCATCCAATCTTTGAAGGACGGAACCTACTACCCTCAGCCTGTCCGAAGAATGTACATC
GCAAAGAAGAACTCTAAGAAGATGAGACCTCTTGGAATCCCAACTTTCACAGACAAGTTGATCCAG
GAGGCTGTGAGAATCATCCTTGAATCTATCTATGAGCCTGTCTTCGAGGATGTGTCTCACGGTTTC
CGACCTCAGCGAAGCTGTACACAGCTTTGAAGACAATCAAGAGAGAGTTCCGAGGTAAATTATAT
GCTTTGCCACTTCCTCAAAAGATCATTTTAGGTTCATTGGTATGTGGTTTTTTTTCTTAACAGGTGC
AAGATGGTTCGTGGAGGGAGATATCAAGGGATGCTTCGATAACATCGACCACGTACACTCATCGG
ACTCATCAACCTTAAGATCAAGGATATGAAGATGAGCCAGTTGATCTACAAGTTCCCTCAAGGCAGG
TTACCTCGAAAACCTGGCAGTACCACAAGACTTACAGCGGAACACCTCAGGGCGGAATCCTCTCTCC
TCTCCTCGCTAACATCTATCTTCATGAATTGGACAAGTTCGTTCTCCAACCTCAAGATGAAGTTCGA
CCGAGAGAGTCCAGAGAGAATCACACCTGAATACCGGGAGCTTACAACGAGATCAAAGAATCTC
TCACCGTCTCAAGAAGTTGGAGGGCGAGGAGAAGGCTAAGGTTCTCTTGAATACCAGGAGAAGAG
GAAGAGGTTGCCTACACTCCCTTGTACATCACAAACAACAAGGTTCGTTCTCTCCATTTTCATT
GTTTGAGTCTGATTTAGTGTTTTTGTGGTTGATCTGAATCGATTATTGTTGATTAGTGAATCAAT
TGAGGCTGTGCTTAATGTTTTGACTTTTTGATTACAGGTCTTGAAGTACGTCCGATACGCTGACGA
CTTCATCATCTCTGTTAAGGGAAGCAAGGAGGACTGTCAATGGATCAAGGAGCAATTGAAGCTCTT
CATCCATAACAAGCTCAAGATGGAATTGAGTGAGGAGAAGACACTCATCACACATAGCAGTCAGCC
TGCTCGTTTTCTCGGATACGACATCCGAGTCAGGAGAAGTGGAACTATCAAGCGATCTGGAAAGGT
TCAATCTTTCTTTCACATTTGACTTGTTCACTCGTTTTATTAACTCTTTAGAAATGGAGATTC
TTACCTCTGTGTGGCTTTTGGCAGGTCAAGAAGAGAACACTCAACGGGAGTGTGGAGCTTCTCATC
CCTCTCCAAGACAAGATCCGTCAATTCATCTTCGACAAGAAGATCGCTATCCAGAAGAAGGATAGC
TCATGGTTCCCAGTTCACAGGAAGTACCTTATCCGTTCAACAGACTTGGAGATCATCACAATCTAC
AACTCTGAATTGAGAGGTAAGCTGCTACCTCAAACCTTCTAGTGCTTCCATATTTCTTTCTTCTG
CAAGGCAGAGAACCATTGTGGTTAAGTGTTTAAATTGTGAATGTATAGGTATCTGCAACTACTAC
GGTCTCGCAAGTAACTTCAACCAGCTCAACTACTTCGCTTACCTTATGGAATACTCTTGCTTGAAG
ACTATCGCATCTAAGCATAAGGGAACACTCTCAAAGACCATCTCTATGTTCAAGGATGGAAGTGGT
TCTTGGGGAAATCCCTTACGAGATCAAGCAGGGGAAGCAGAGGAGATACTTCGCCAACTTCAGTGAA
TGCAAATCTCCTTACCAATTCACTGATGAGATCAGTCAAGCTCCTGTGCTTTACGGATACGCTCGG
AACACTCTTGAGAACAGACTTAAGGCTAAGTGTGTGAGCTTTGTGGAACATCTGATGAGAACACA
TCTTACGAGATCCACCACGTCAACAAGGTCAAGAACCCTAAGGGAAAGGAGAAGTGGGAGATGGCA
ATGATCGCTAAGCAGCGGAAGACTCTTGTGTTGCTTCCATTGTCATCGTCACGTGATCCATAAG
CACAAAGTGAAGTAGTAA

SEQ ID NO.32

El gen LtrA se fusionó traduccionalmente con el péptido de tránsito de cloroplasto (GR-CTP) del gen de subunidad pequeña de Rubisco de tabaco (Acceso Bank No. AY220079), que se amplificó utilizando los siguientes cebadores de PCR:

ES 2 614 499 T3

AS794 GCTCGAGACAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCTCT SEQ ID NO.33
AS639 CGCATGCTACCTGCATACATTGCACTCTTCCACCAT SEQ ID NO.34

Secuencia rbcS-CTP

CTCGAGACAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCTCTGCAGCAGTTGCCACTCGCACCAATGTTGCTCAA
GCTAACATGGTTGCACCTTTCCTGCTTAAGTCAGCTGCCTCATTCCCTGTTTCAAGGAAGCAA
AACCTTGACATCACTTCCATTGCTAGCAATGGTGGAAGAGTGCAATGTATGCAGGTAGCATGC

SEQ ID NO.34

- 5 La región promotora 5' del gen 3 ubiquitina de Arabidopsis se amplificó con los siguientes cebadores:

AS724 CGGTACCTACCGGATTTGGAGCCAAGTC SEQ ID NO.35
AS726 GTGTTTGGTGACCTGAAATAAAACAATAGAACAAGT SEQ ID NO.36

Secuencia promotora de ubiq3 de Arabidopsis

TACCGGATTTGGAGCCAAGTCTCATAAACGCCATTGTGGAAGAAAGTCTTGAGTTGGTGGTAATGT
AACAGAGTAGTAAGAACAGAGAAGAGAGAGAGTGTGAGATACATGAATTGTCGGGCAACAAAAATC
CTGAACATCTTATTTTAGCAAAGAGAAAGAGTTCAGAGTCTGTAGCAGAAGAGTGAGGAGAAATTT
AAGCTCTTGGACTTGTGAATTGTTCCGCCTCTTGAATACTTCTTCAATCCTCATATATTCTTCTTC
TATGTTACCTGAAAACCGGCATTTAATCTCGCGGGTTTATTCGGTTCAACATTTTTTTTGTTTTG
AGTTATTATCTGGGCTTAATAACGCAGGCCGAAATAAATTCAGGCCCAACTGTTTTTTTTTTTA
AGAAGTTGCTGTTAAAAAAAAAAAAAGGGAATTAACAACAACAACAAAAAAGATAAAGAAAATAA
TAACAATTACTTTAATTGTAGACTAAAAAACATAGATTTTATCATGAAAAAAGAGAAAAGAAAT
AAAAACTTGATCAAAAAAAAAACATACAGATCTTCTAATTATTAACCTTTCTTAAAAATTAGGTC
CTTTTTCCCAACAATTAGGTTTAGAGTTTGGAAATTAACCAAAAAGATTGTTCTAAAAATACTC
AAATTTGGTAGATAAGTTTCCTTATTTAATTAGTCAATGGTAGATACTTTTTTTTCTTTCTTTA
TTAGAGTAGATTAGAATCTTTTATGCCAAGTATTGATAAATTAATCAAGAAGATAAACTATCATA
ATCAACATGAAATTAAGAAAAATCTCATATATAGTATTAGTATTCTCTATATATATTATGATTG
CTTATTCTTAATGGGTTGGGTTAACCAAGACATAGTCTTAATGGAAAGAATCTTTTTTGAACCTTT
TCCTTATTGATTAAATCTTCTATAGAAAAGAAAGAAATTTTGGAGAAAAGTATATACAAAAAG
AAAAATAGAAAAATGTCAGTGAAGCAGATGTAATGGATGACCTAATCCAACCACCACCATAGGATG

TTTCTACTTGAGTCGGTCTTTTAAAAACGCACGGTGGAAAATATGACACGTATCATATGATTCCTT
 CCTTTAGTTTTCGTGATAATAATCCTCAACTGATATCTTCCTTTTTTTGTTTTGGCTAAAGATATTT
 TATTCTCATTAAATAGAAAAGACGGTTTTGGGCTTTTGGTTTGCATATAAAGAAGACCTTCGTGTG
 GAAGATAATAATTCATCCTTTTCGTCTTTTCTGACTCTCAATCTCTCCCAAAGCCTAAAGCGATC
 TCTGCAAATCTCTCGCGACTCTCTCTTTCAAGGTATATTTTCTGATTCTTTTTGTTTTGATTCGT
 ATCTGATCTCCAATTTTTGTTATGTGGATTATTGAATCTTTTGTATAAATTGCTTTTGACAATATT
 GTTCGTTTTCGTCAATCCAGCTTCTAAATTTTGCCTGATTACTAAGATATCGATTTCGTAGTGTTTA
 CATCTGTGTAATTTCTTGCTTGATTGTGAAATTAGGATTTTCAAGGACGATCTATTCAATTTTTGT
 GTTTTCTTTGTTTCGATTCTCTCTGTTTTAGGTTTTCTTATGTTTAGATCCGTTTCTCTTTGGTGTTG
 TTTTGATTTCTCTTACGGCTTTTGATTGGTATATGTTTCGCTGATTGGTTTCTACTTGTTCTATTG
 TTTTATTTTCAGGTCACCAAACA

SEQ ID NO.37

El fragmento terminador nos se sintetizó con base en el acceso de secuencia de banco de genes EU048864.

Secuencia terminadora nos

TCTAGAGTCAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCG
 GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTGAAGCATGTAATAATTAACATGTAAT
 GCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGA
 TAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
 ATCGACCTGCAG

SEQ ID NO.38

5

El gen de la transcriptasa RNasa H inversa del clon de levadura Ty1-H3 (Boeke et al., Mol. Cellul. Biology (1988), 8: 1432-1442; acceso bank No. M18706) se optimizó para uso de codón en plantas, y mediante inserción de 5 intrones de genoma de Arabidopsis (intrón 1- de At1g04820, intrón 2- de At2g29550, intrón 3- de At1g31810, intrón 4 y 5- de At1g09170). Los intrones están subrayados y aparecen en negrita. El clon se sintetizó por el proveedor de síntesis de ADN comercial y fue nombrado como RTRHi-Ty1.

10

Secuencia RTRHi-Ty1

ATGAACAATTCATCCACAACATCGTTCCATCAAGACTCCAACACTGTTTCTGAGCAGAACACT
 GAAGAATCTATCATCGCTGATCTTCCACTTCCTGATCTTCTCCAGAATCTCCTACTGAATTTCTT
 GATCCATTCAAAGAACTTCCACCTATCAACTCAAGACAACTAACTCTTCATTGGGCGGAATTGGC
 GATTCTAATGCTTACACTACTATCAACTCTAAGAAGAG**GTATTGTAGCCAGCCTCAACCAGTCTTT**
TTGCTGTTACATTTTCTTGGGCTCATCTAATGTTATTTTCTATTTTGTTCAGGTCACTTGAAG
 ATAATGAACTGAAATCAAAGTTTCTAGGGATACATGGAATACTAAGAATATGAGATCACTTGAAC

CTCCAAGATCTAAGAAGAGAATCCATCTTATTGCAGCTGTTAAAGCTGTGAAATCAATCAAACCAA
 TTAGAACAACCTCTTAGATACGATGAAGCAATTACATACAACAAAGACATCAAGGAGAAGGAGAAAT
 ACATCGAGGCTTACCACAAAGAAGTTAACCAACTTCTTAAGATGAAAACCTGGGATACTGATGAAT
 ACTACGATAGAAAAGAGATTGACCCTAAGAGAGTTATCAACTCAATGTTTCATCTTCAACAAGAAGA
 GAGACGGAACCTACAAAGCTAGATTCGTTGCAAGAGGAGATATTCAGCATCCTGACACTTACGATT
CAGGTAAGTATTCCAATGTTCTTCGATTATGAGTCAATGTTGTTACTGTATCTGTCTCTGTGGTTT
ATTGTTTCAGGCTTAGTTATTGATTAGTATTGAACTTCACTCACATATTTTTTTGTTTGTTCCT
GAATTGTGCAGGTATGCAATCTAATACTGTTTCATCACTACGCATTGATGACATCTCTTTCACTTGC
 ATTGGACAATAACTACTACATTACACAACCTTGACATATCTTCTGCATACCTTTACGCTGATATCAA
 GGAGGAGCTTTACATTAGACCTCCACCACATTTGGGAATGAATGATAAGTTGATCCGTTTGAAGAA
 ATCACTTTACGGATTGAAACAATCTGGAGCTAATTGGTACGAAACTATCAAATCATACCTTATTCA
 GCAATGCGGTATGGAGGAAGTTAGGGGATGGTCATGCGTATTCAAGAACTCTCAAGTTACAATCTG
 CCTCTTCGTTGATGATATGGTGCTCTTCTCTAAGAATCTTAACCTCAAACAAGAGAATCATTGAGAA
 GTTGAAGATGCAATACGACACTAAGATCATCAACCTTGGAGAATCTGATGAGGAAATTCAATACGA
 CATTCTTGGATTGGAAATCAAATACCAAAGAGGTGAGTTATATTTAACAGCTCATCAGTTACTTAA
ACACTTTTTGGGACAAGCAGTTCAAACCTCATGTTCCAATCTAAAATTAATTGCAATTCACAGGTA
 AGTACATGAAGTTGGGAATGGAAAACCTCATTGACTGAGAAGATTCCCTAACTTAACGTTCCCTTGA
 ATCCAAAGGGAAGAAAGCTCTCTGCTCCAGGACAACCAGGACTTTACATTGACCAGGATGAACTTG
 AGATTGATGAGGATGAATACAAGGAGAAAGTACACGAGATGCAGAAGTTGATTGGACTTGCTTCAT
 ACGTTGGATACAAATTCAGATTTCGACCTTCTTTACTACATCAACACACTTGCTCAGCATATACTTT
 TCCCATCTAGGCAAGTTCTTGACATGACATACGAGCTTATCCAATTCATGTGGGACACTAGAGACA
 AGCAACTCATATGGCACAAGAACAAGCCTACAGAGCCAGATAACAAGCTCGTTGCAATCTCTGATG
 CTTCTTACGGAAACCAACCATACTACAAATCACAAATTGAAACATCTACTTGCTTAACGGAAAGG
TACTTTTCTCAAAGACTTTACCTTATTGTGGAATATTGAATTTTCTGAAAGACTTCACCTTATCTA
CATTTGTAATTTTACTATGGTAATCAGGTGATTGGAGGAAAGAGCACTAAGGCTTCACTTACATGC
 ACTTCAACTACTGAGGCAGAGATCCACGCTATATCAGAATCTGTACCACTTCTTAACAACCTTCT
 TACCTTATCCAAGAGCTTAACAAGAAGCCAATCATCAAGGACTTCTTACTGACTCAAGATCAACA
 ATCTCTATCATTAACTTACAAATGAAGAGAAATTCAGAAACAGATTCTTCGGAACAAAGGCAATG
 AACTTAGAGATGAAGTTTCAGGTAAGTATTAACCTACCAAATGATCAATATTTTTGAAATGCA
GGTTTTAGAATAACTCTCTGCCGTTCTTGTTTATTTCAGGTAACAACCTTTACGTTTACTACA
 TCGAGACTAAGAAGAACATTGCTGACGTTATGACAAAGCCTCTTCTATCAAGACCTTCAAGTTGC
 TTAATAACAAATGGATTCATTAA

SEQ ID NO.39

5 La secuencia RT-RH-Ty1 se fusionó traduccionalmente con el péptido de tránsito de cloroplasto de proteína de choque térmico Hsp60 de cloroplasto de guisante (No. de acceso L03299). La secuencia para el péptido de tránsito (Hsp60-CTP) se amplificó de ADN genómico de guisante utilizando los siguientes cebadores de PCR:

AS293 TCTCGAGTTGATGGCTTCTTCTGCTCAAATA SEQ ID NO.40

AS294 GGCATGCAACTCTCAAAGTGAAACCCTTC SEQ ID NO.41

Secuencia Hsp60-CTP

CTCGAGATGGCTTCTTCTGCTCAAATACACGGTCTCGGAACCGCTTCTTTCTCTTCCCTCAAAAA
 CCCTCTTCCATTTCCGGTAATTCCAAAACCTTTTCTTCGGTCAGCGACTCAATTCCAACCACTCT
 CCCTTACCCGCGCCGCATTCCCTAAGTTAAGTAGCAAAACCTTTAAGAAGGGTTTCACTTTGAGA
 GTTGCATGC SEQ ID NO.42

5

La expresión de la fusión de RTRHi-Ty1 y Hsp60-CTP se accionó por el promotor de gen TAF2 del gel taf2 de Arabidopsis. Se amplificó de ADN genómico de Arabidopsis (Col-0) utilizando el siguiente conjunto de cebadores:

AG3 GGTACCATGATCGCTTCATGTTTTATC SEQ ID NO.43
AG4 CTCGAGGTTCTTTTTGCCGATATGTTAG SEQ ID NO.44

10 Secuencia de promotor TAF2

GTACCATGATCGCTTCATGTTTTATCTAATTTGTTAGCATATTGAATGATTGATTTTCTTTAAT
 TTGGATATGTTGATTGTCTTGTTCATCATCAATGTATGTTTTATTTAACACCGGAAGATCTTATG
 ATGGGTTCACTTTCATAATAATCTCCGAGTTCTACAAGACTACAACCTTTCACGTGACTTTTACA
 GCGACAAAAAATGCATCTAGCGAAAATTAATCCACAACCTATGCATTTTTGTCACTCTTCACACGC
 GTATGTGCATAAATATATAGTATATACTCGACAATCGATGCGTATGTGTACACAATTACCAAAACA
 ATTATTTGAATATTCAGACATGGGTTGACATCACCAAGTAATATTCACAGTATCTGAAAACATGT
 TTTGACATCCCTAAATAGTTTGACTAACCAGTTAATATGAGAGCATTTGTAAGAGGCAAGAGCCA
 TGGTTTTGTTGGCTCGTTAATATGCTCATTTAACCCCCCAAAAAATACTATTAGATTTAAACGT
 AAAAGAATTAACGAACACAAGAACTGCTAAAACAAAAAATCAATGGCCGACATTTCATAGTTC
 ATACATCACTAATACTAAAAGATGCATCATTTCACTAGGGTCTCATGAAATAGGAGTTGACATTTT
 TTTTTGTAACGACAGAAGTTGACATGTTAAGCATCAATTTTTTTAAGAGTGGATTATACTAGTTTT
 TTTTTTTTTTTAATGTATGGTATGATACAACAACAAAACTATAAAATAGAAAAAGTCAGTGAA
 ACCTCAAATGAAGGAAAACTTTTGACAAAAAGAGAGAGAGAGAAAGAATGTAATCCAAAT
 AAATGGGCCTAATTGAGAATGCTTTAACTTTTTTTTTTTGGCTAAAAGAGAATGCTTTAACTAAGC
 CCATAAAATGAACATCAAACCTCAAAGGGTAAGATTAATACATTTAGAAAACAATAGCCGAATATTT
 AATAAGTTTAAGACATAGAGGAGTTTTATGTAATTTAGGAACCGATCCATCGTTGGCTGTATAAAA
 AGGTTACATCTCCGGCTAACATATCGGCAAAAAGGAACCTCGAG SEQ ID NO.45

La señal polyA de sintasa agropina (terminador ags) se sintetizó con base en la secuencia de banco de genes EU181145.

La secuencia de terminación ags

```
GAATTAACAGAGGTGGATGGACAGACCCGTTCTTACACCGGACTGGGCGCGGGATAGGATATTCAG
ATTGGGATGGGATTGAGCTTAAAGCCGGCGCTGAGACCATGCTCAAGGTAGGCAATGTCCTCAGCG
TCGAGCCCGGCATCTATGTCGAGGGCATTGGTGGAGCGCGCTTCGGGGATACCGTGCTTGTAAC TG
AGACCGGATATGAGGCCCTCACTCCGCTTGATCTTGGCAAAGATATTTGACGCATTTATTAGTATG
TGTTAATTTTCATTTGCAGTGCAGTATTTTCTATTTCGATCTTTATGTAATTCGTTACAATTAATAA
ATATTCAAATCAGATTATTGACTGTCATTTGTATCAAATCGTGTTAATGGATATTTTTATTATAA
TATTGATGAT
```

SEQ ID No. 46

Transformación de plantas de Arabidopsis

- 5 La transformación de plantas de Arabidopsis se realizó como se describe por Clough & Bent (Clough & Bent (1998) Plant Journal 16:735-743). Se utilizó la cepa de Agrobacterium tumefaciens GV3101 (Koncz & Schell (1986) Mol Gen Genet 204:383-396) para la transformación. La transformación de plantas se llevó a cabo con construcciones de transformación de cloroplasto (Figura 2), basadas en el vector binario pGreen 0029 (Hellens et al (2000) Plant Mol. Biol. 42: 819-832). En resumen, un casete de transformación del cloroplasto que contiene trnI flanco, promotor Prn, gen aadA, psbA 3' UTR, flanco trnA y dominio de unión de cebador (PBD) se insertó en el dominio IV de LtrB o se fusionó a CTL de ASB utilizando enzimas Ascl-NotI. El fragmento de ADN resultante se fusionó con el promotor 35S y el terminador nos y se introdujo en el vector binario pGreen0029 (EU048864). El fragmento de LtrAsi se fusionó a un péptido de tránsito de cloroplasto (GR-CTP) y promotor ubiq3 de Arabidopsis. El casete resultante se insertó en pGreen 0029 junto con el casete de transformación de cloroplastos. La transcriptasa RNasa H inversa (RTRHi-Ty1) se fusionó al péptido de tránsito Hsp60-CTP, el promotor TAF2 y el terminador ags. El casete resultante se insertó en el vector pSoup (EU048870) que lleva T-ADN del vector pGreen0179 (EU048866). La construcción que lleva el casete de cloroplasto y LtrAsi se cotransformó con la construcción que lleva casete RTRHi-Ty1 en la misma cepa de Agrobacterium y se utiliza para la transformación de Arabidopsis (Col-0).

Las estirpes transgénicas se recuperaron en medio de selección suplementado con 100 mg/l de espectinomicina.

20 Transformación de plantas de tabaco

Las plantas de tabaco se transformaron como se describe por Horsch et al., (1985) Science 227: 1229-1231, utilizando cepa AGL1 de Agrobacterium (véase protocolo a continuación).

25 Las construcciones fueron similares a las construcciones utilizadas para la transformación de Arabidopsis con excepción de las secuencias de flanqueo trnI y trnA del casete de cloroplasto se amplificaron de ADN genómico de tabaco (Figura 2).

Las plantas de tabaco transgénicas se regeneraron en medio de selección suplementado con 500 mg/l de espectinomicina.

Transformación de explantes de hojas de tabaco con cepa AGL1 de Agrobacterium

Todos los artículos se esterilizan en autoclave antes de uso.

30 El filtro esteriliza los antibióticos para prevenir el crecimiento de hongos, mantener a los antibióticos para cultivo de tejidos de planta en caja separada

35 Esterilizar material de planta: tomar las plantas de aproximadamente 9 cm de alto, que no deberían haber empezado a florecer. Cortar las hojas con cutícula (4-6 hojas por construcción, lo suficiente para cortar 100 explantes), se sumerge en etanol al 70% y se sumerge inmediatamente en hipoclorito de Na al 1% (cat. No. 01032500; utilice botella de blanqueador que no tenga más de 3 meses de edad, ya que se evapora el gas de cloro), mantenga las hojas con unas pinzas y agite por 20 min. Evite dañar la cutícula de otro modo blanqueada, que entrará en el sistema vascular. Enjuague brevemente en agua estéril 5-6 veces y deje en agua hasta que esté listo para ser cortado.

Co-cultivo de agro con explantes de tabaco: se hace crecer AGL1 en caldo de LB o L con los antibióticos apropiados durante la noche a 28-30°C, al día siguiente se vuelven a suspender en solución agro de cocultivo de tal manera que la

- concentración final es de alrededor de 0.4-0.6 DO_{600nm}. Coloque las hojas de tabaco en el caldo de cocultivo y corte cuadrados de 1-1.5 cm x 1-1.5 cm con un bisturí estéril redondeado utilizando una acción de rodadura. Sumerja los explantes de hoja en la solución agro con pinzas estériles (almacenadas en etanol al 100%, flamee y deje que se enfríe antes de tocar el tejido de la hoja) se necesita la mancha en papel Whatman estéril y transfiera sobre placas de TSM no selectivas (6 explantes por placa) para preparar aproximadamente 15 placas por construcción. Repita este procedimiento para cada construcción, asegurándose de que el bisturí y unas pinzas se sumergen en etanol y se flamean entre cada construcción para evitar la contaminación cruzada. Deje durante 2 días solo para AGL1 (3-4 días para otras cepas agro)
- 5
- Transferencia en placas selectivas de TSM: utilice pinzas estériles para recoger y lavar los explantes en 100 ml de caldo cocultivo suplementado con 320 mg/l de timentina (un pote por construcción), agitar bien, secar sobre papel Whatman estéril y colocar los explantes lavados en placas de TSM selectivas suplementadas con antibióticos selectivos apropiados y timentina 320 mg/l para matar *Agrobacterium*.
- 10
- Regeneración de brotes: tarda alrededor de 1 mes para que aparezcan los brotes, los explantes deben ser transferidos en placas frescas cada 10-14 días. Observe hacia fuera para el crecimiento recurrente de AGL1, si la timentina no es suficiente para matar agro, añade cefotaxima 250 mg/l.
- 15
- Regeneración de la raíz: Toma alrededor de 1 semana. Los brotes se cortan de los explantes y se colocan en cajas de crecimiento que contienen TRM suplementado con los antibióticos apropiados selectivos y timentina 320 mg/l + cefotaxima 250 mg/l para evitar el crecimiento de *Agrobacterium* recurrente.
- Mantener plantas en cajas de TRM: sustituya cada dos semanas hasta que esté listo para ser transferido al invernadero
- 20
- Adaptación a condiciones de invernadero: remoje gránulos de turba en agua estéril hasta que se hinchan a su tamaño normal y coloque cuidadosamente una planta por gránulo, se incuban las plantas por debajo de 100% de condiciones de humedad en un propagador, abriendo gradualmente las pequeñas ventanas hasta que las plantas se adaptan a la atmósfera normal durante varios días.
- Recetas:
- 25
- Cocultivo: MS con vitaminas y MES + 0.1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BA + 3% de sacarosa, pH 5.7
- TSM: MS con vitaminas y MES + 0.1 mg/l de NAA + 1 mg/l de BA + 3% de sacarosa, pH 5.7, 0.2% de gelrita
- TRM: ½ de sales MS con vitaminas y MES + 0.5% de sacarosa, pH 5.7, 0.2% de gelrita.
- Autoclave.
- Concentración de antibióticos
- 30
- Para cultivos LB o L de *Agrobacterium*:
- Para crecer AGL1 llevar pGreen/pSoup: carbenicilina 100 mg/l, tetraciclina 5 mg/ml, rifampicina 50 mg/ml, kanamicina 50 mg/ml
- AGL1 que lleva pSoup: carbenicilina 100 mg/l, Tetraciclina 5 mg/ml, rifampicina 50 mg/ml.
- AGL1 vacío: carbenicilina 100 mg/l, 50 mg rifampicina/ml.
- 35
- Para cultivo de plantas:
- Kanamicina: 300 mg/l (100 mg/l si se utiliza benthamiana)
- Higromicina: 30 mg/l (10 mg/l si se utiliza benthamiana)
- PPT: 20 mg/l (2 mg/l si se utiliza benthamiana)
- Espectinomocina: 500 mg/l
- 40
- Timentina: 320 mg/l. Se utiliza para matar agro, pequeña cantidad bastante inestable constituida, para almacenamiento, almacenar en el congelador por hasta 1 mes después de que el antibiótico no es más eficiente.

Cefotaxima: 250 mg/l. También se utiliza para matar agro, agregue a TS

Análisis PCR de plantas transgénicas.

Los siguientes cebadores se han utilizado para la amplificación de secuencias flanqueantes de unión:

LFS1	GAGATGTGGATCATCCAAGGCA	SEQ ID NO.47
RFS1	CTACCATAGAGGCCAACGATAG	SEQ ID NO.48
AS527	AACGTCGGTTCGAGATGG (aadA-R1)	SEQ ID NO.49
aadA-F1	CGAAGGATGTCGCTGCCGACT;	SEQ ID NO.50

5 y cebadores anidados:

LFS2	CTCCTCCTCAGGAGGATAGATG	SEQ ID NO.51
RFS2	AACTTTCATCGTACTGTGCTCTC	SEQ ID NO.52
AS526	GAGTCGATACTTCGGCGATC(aadA-R2)	SEQ ID NO.53
aadA-F2	CTAGACAGGCTTATCTTGACA	SEQ ID NO.54

Los siguientes cebadores se utilizaron para la amplificación de la sonda de cloroplasto para hibridación Southern:

LP-F	CGTGTTTAGTTGCCATCGTTGA	SEQ ID NO.55
LP-R	GCTGAGAGCCCTCACAGCCCA	SEQ ID NO.56
RP-F	TGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTA	SEQ ID NO.57
RP-R	TAACCAAGCCACTGCCTATGAGT	SEQ ID NO.58

10

Los siguientes cebadores se utilizaron para la amplificación del gen aadA como una sonda para hibridación de Northern:

aadA1	GTGATCGCCGAAGTATCGACT	SEQ ID NO.59
aadA2	ATCTCGCCTTTCACGTAGTGG	SEQ ID NO.60

Resultados y Discusión

15 La transformación de Arabidopsis y tabaco con nuestros vectores que contienen casetes de transgén generaron plantas transgénicas de cloroplastos por selección en medio suplementado con 100 mg/l de espectinomicina para Arabidopsis y 500 mg/l para tabaco (Figura 2). En todos los casos hemos sido capaces de detectar la inserción del casete de transgén en el genoma del cloroplasto utilizando amplificación por PCR de las regiones de unión. Cinco estirpes transgénicas independientes se analizaron para todas las construcciones y podían amplificar el fragmento de ADN de tamaño
20 correcto para uniones de inserción en todas las estirpes. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y se confirmaron los sitios de inserción correctos.

También se realizó análisis Southern y Northern para confirmar la presencia de la inserción y las transcripciones del cloroplasto.

Sección experimental 1B

25 Las modificaciones del método de transformación del cloroplasto utilizado en la sección experimental 1A se puede mejorar utilizando PBD diseñada para transcripción inversa en el citoplasma o en plastidios, y mediante el reposicionamiento de los elementos fundamentales del casete de transformación (Figura 3).

30 El grupo de construcciones se preparó para transformación de tabaco y arroz con intrón LtrB (LtrB-CTS) o con secuencias de ASB (ASB-CTS) como el CTS (Figura 4-6). El posicionamiento de los elementos fundamentales del casete de transgén se diseñó como se describe en la Figura 3, A-B para LtrB-CTS y la Figura 3, C-D para ASB-CTS.

El PBD-CHL se diseñó como se describió anteriormente.

El dominio de unión de cebador de retrotransposon Tnt1 de tabaco se utilizó como el PBD-CYT, y se amplificó de ADN genómico de tabaco cv Petit Gerard utilizando los siguientes cebadores:

AS912 GCCGCGGCTTTATTACCGTGAATATTA SEQ ID NO.61
 AS913 CGCGGCCGCTCTGATAAGTGCAACCTGATT SEQ ID NO.62

5

PBD-CYT

CTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGGTTTATTCCCAACAACCTGGTATCAGAGCACAGGT
 TCTGCTCGTTCACTGAAATACTATTCACTGTCGGTAGTACTATACTTGGTGAAAAATAAAAATGTC
 TGGAGTAAAGTACGAGGTAGCAAAATTCAATGGAGATAACGGTTTCTCAACATGGCAAAGAAGGAT
 GAGAGATCTGCTCATCCAACAAGGATTACACAAGGTTCTAGATGTTGATTCCAAAAAGCCTGATAC
 CATGAAAGCTGAGGATTGGGCTGACTTGGATGAAAGAGCTGCTAGTGCAATCAGGTTGCACTTATC
 AGA

SEQ ID NO.63

10 En el primer caso, el PBD-CHL se fusionó al extremo 3' del intrón LtrB (figura 3A, figura 4A para el tabaco y figura 5A para el arroz). Como la proteína LtrA posee característica de unión LtrB-CTS y actividad de transcripción inversa se pueden cumplir ambas funciones de la translocación de ARN transgén en plastidios y la transcripción inversa del casete de ARN utilizando plastidios tRNA-Met como un cebador.

15 En el segundo caso, el PBD-CYT se fusionó a CTU (figura 3B, figura 4B para el tabaco y figura 5B para el arroz), de tal manera que la transcripción inversa del casete del transgén se inicia y se lleva a cabo por transcriptasas inversas endógenas en el citoplasma utilizando tRNA-Met citoplásmico. La proteína LtrA sirve como péptido de unión a CTS para la translocación del complejo ARN: ADN iniciado por las transcriptasas inversas en los plastidios.

El ASB-CTS se fusionó a la CTU con PBD-CHL o AP-CYT (figura 3 C-D, figura 6, A y B). La transcriptasa inversa del retrotransposón de levadura Ty1 fue cosuministrada con la construcción que contiene PBD-CHL para facilitar la reacción de transcripción inversa en los plastidios.

El casete de cloroplasto para la transformación de arroz se diseñó utilizando secuencias específicas a arroz (Fig 5).

20 El fragmento trnI del genoma del cloroplasto de arroz se utilizó como el EPA, y se amplificó utilizando los siguientes cebadores:

AS699 GGCGCGCCGTGGGATCCGGGCGGTCCG SEQ ID NO.64
 AS700 GGCATGCTGGCGCAGCTGGGCCATCC SEQ ID NO.65

Arroz trnI-LFS

Gggatccgggcggtccgggggggcaactacggctcctctcttctcgagaatccatacatcccttat
cagtgtatggagagctatctctcgagcacagggtgaggttcgctcctcaatgggaaaatggagcacc
taacaacgcatcttcacagaccaagaactacgagatcaccccttcattctgggggtgacggaggat
cgtaccattcgagcctttttttcatgcttttcccgcggtctggagaaagcagcaatcaataggac
ttccctaactcctcccttctgaaaggaagaacgtgaaattcttttcccttccgcagggaccagga
ggttggatctagccataagaggaatgcttggataaataagccacttcttggctctcgactccta
agtcactacgagcgcctcgcacagtgcacatgggatgtggctatttatctatctcttgactcgaaa
tgggagcagagcaggtttgaaaaggatcttagagtgtctagggttgggccaggagggtctcttaa
cgcttctcttttctgcccacgaggtatttcccaaggacttgccatggtaagggggagaagggg
aagaagcacacttgaagagcgcagtaacaacggagagttgtatgctgctcggttcgggaaggatgaatcg
ctcccgaaggaggtctattgattctctcccaattgggtggatcgtaggggcgatgatttacttca
cgggcgaggtctctggttcaagtccaggatggcccagctgcgcca SEQ ID NO.66

El fragmento trnA del genoma del cloroplasto de arroz se utilizó como el RFS, y se amplificó utilizando los siguientes cebadores:

AS701	gatatggatggcccagctgcgcca	SEQ ID NO.67
AS702	Gggccgcattgcccttctccgacct	SEQ ID NO.68

5 Arroz ARNt RFS

Ggatggcccagctgcgcccagggaaaagaatagaagaagcatctgactctttcatgcatactccact
tggctcggggggatatagctcagttggttagagctccgctcttgcaattgggtcgttgcgattacgg
gttggctgtctaattgtccaggcggtaatggtagtatcttgtacctgaaccgggtggctcactttt
ctaagtaatggggaagaggactgaaacatgccactgaaagactctactgagacaaaaagatgggct
gtcaaaaaggtagaggaggtaggatgggcagttggtcagatctagtatggatcgtacatggacgat
agttggagtcggcggctctcctaggcttccctcatctgggatccctggggaagaggatcaagtgg
cccttgcgaatagcttgatgcactatctcccttcaaccctttgagcgaatgtggcaaaaaggaag
aaaatccatggaccgacccattatctccaccccgtaggaactacgagatcacccaaggacgcct
tcggcgtccaggggtcacggaccgacatagaccctgttcaataagtggaaacacattagccgtccg
ctctccggttgggcagtaagggtcggagaagggcaat

SEQ ID NO.69

El promotor rrn16 específico a cloroplasto de trigo cv. Pavon se amplificó utilizando PCR con los siguientes cebadores:

AS518	ATCGATAACATTCTCTAATTTTCATTGCA	SEQ ID NO.70
AS720	GG CATGCAGGCTTGTGGGATTGACGTGATAG	SEQ ID NO.71

10 Secuencia de promotor rrn de trigo (Wrrn)

Aggcttgtgggattgacgtgatagggtagggttggctatactgctggtggcgaactccaggctaataatctgaagcgcgatggatacaagttatccttgggaaggaaagacaattccgaatctgctttgtctacgaataaggaagctataagtaatgcaactatgaatctcatg

SEQ ID NO.72

Secuencia de fusión aadA-mGFP4

atggcagaagcgggtgatcgccgaagtatcgactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgc
catctcgaaccgacggttctggtgcccgtacatttgtacggctccgcagtggtggcggcctgaagcca
cacagtgatattgatttctggttacggtgaccgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagctttg

atcaacgaccttttgaaacttcggcttcccctggagagagcgagattctccgcgctgtagaagtc
accattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatccagctaagcgcgaactgcaatttggga
gaatggcagcgcgaatgacattcttgcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggct
atcttctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggttaggtccagcggcggaggaactcttt
gatccggttctcgaacaggatctatttgaggcgctaaatgaaaccttaacgctatggaaactcgccg
cccgactgggctggcgtatgagcgaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagta
accggcaaatcgcgccgaaggatgtcgtgcccactgggcaatggagcgcctgccggcccagtat
cagcccgtcatacttgaagctagacaggcttatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgc
gcagatcagttggaagaatttgtccactacgtgaaaggcgagatcaccaaggtagtcggcaaatca
ggatccatgagtaaaggagaagaacttttcaactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggt
gatgttaatgggcacaaattttctgtcagtgaggaggggtgaaggatgcaacatacggaaaactt
acccttaaatttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactacttcc
tcttatggtgttcaatgcttttcaagatacccagatcatatgaagcggcacgacttcttcaagagc
gccatgcctgagggatacgtgcaggagaggaccatcttcttcaaggacgacgggaactacaagaca
cgtgctgaagtcaagtttgaggagacaccctcgtcaacaggatcgagcttaaggaatcgatttc
aaggaggacggaaacatcctcggccacaagttggaatacaactacaactcccacaacgtatacatc
atggcagacaaaacaaagaatggaatcaaagttaacttcaaaattagacacaacattgaagatgga
agcgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgtatggccctgtccttttacc
gacaaccattacctgtccacacaatctgcctttcgaagatcccacgaaaagagagaccacatg
gtccttcttgagtttgaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaataatct
aga

SEQ ID NO.73

Se amplificó el terminador atpA de ADN de trigo utilizando los siguientes cebadores:

AS753	Accgcggtcaataaaatgtcatgtcta	SEQ ID NO.74
AS723	Gatattccatactccttcttatgata	SEQ ID NO.75

5

Terminador atpA de trigo

ES 2 614 499 T3

Escisión de embriones inmaduros

Día 1:

Retirar las semillas inmaduras de etapa lechosa/post-lechosa de panículas (se desean embriones inmaduros de 1-2 mm de tamaño).

- 5 Esterilizar semillas inmaduras: hipoclorito de sodio al 50% (12%) + 1 gota de Tween 20. Agitar 10 min.

Enjuagar 3-5x en agua desionizada estéril. Escurrir el exceso de agua. Las semillas de alícuotas (alrededor de 40) se colocan en placas de Petri estériles.

- 10 Establecer una placa de Petri de 60 x 15 mm que contiene una solución al 50% de hipoclorito de sodio y junto a esta un vaso de precipitación estéril en su lado con un papel de filtro estéril en esta. Utilizar pinzas estériles para eliminar de forma aséptica glumas de la primera semilla. Sumergir esta semilla en el hipoclorito de sodio al 50%. Eliminar las glumas de una segunda semilla y sumergir la segunda semilla en solución de hipoclorito de sodio, mientras tanto eliminar la primera semilla y almacenar esta semilla descascarillada/esterilizada en el papel de filtro en el vaso de precipitación. Continúe de esta manera con todas las semillas.

Después se eliminan todas las glumas:

- 15 Esterilizar semillas descascarilladas: hipoclorito de sodio al 50%: 5 min. con agitación.

Enjuague: 5-7 x en agua desionizada estéril, escurrir.

Colocar todas las semillas en una placa de Petri estéril grande. Alícuota para la escisión de embriones (mantener las semillas secas, trabajar sólo con 50-100 en el plato a la vez dejando el resto de la placa maestra).

- 20 Eliminar el embrión de cada semilla y colocar el embrión, el escutelo se deja hacia arriba, en una placa de Petri de 90 x 15 mm que contiene medio de proliferación (40-50 embriones/placa). Cultivar a 28°C en la oscuridad durante 2 días antes del bombardeo

Día 3:

Verificar cada embrión para contaminación antes de limpieza

- 25 Retirar los embriones del medio de proliferación. Distribuir 35 a 40 escutelo de embriones hacia arriba en un área de 1 cm² en el centro de una placa objetivo de 60 x 15 mm que contiene 10 ml de medio de proliferación + tratamiento osmótico (0.6 M). Verificar cada placa objetivo de tal manera que el escutelo es recto. Permitir suficiente espacio para que los escutelos no se hagan sombra unos a otros.

Bombardeo:

Pistola	14 kV
	Vacío: 25 pulgadas de Hg
1 ^{er} bombardeo	4 horas después de tratamiento osmótico
2 ^{do} bombardeo	4 horas después de 1 ^{er} bombardeo

- 30 Día 4:

4 a 16 horas después de la 2^a transferencia a chorro de embriones inmaduros al medio de proliferación sin tratamiento osmótico. Cultivo en la oscuridad a 28°C durante 2 días.

Selección:

Día 5:

Cortar asépticamente con tijeras el brote germinación. Transferir 16 a 20 embriones inmaduros a medio de proliferación fresco que contienen 30 a 50 mg/l de higromicina (dependiendo del genotipo); cultivar en la oscuridad a 28°C; número total récord de embriones.

- 5 Después de 10 días eliminar cuidadosamente el callo desde el escutelo al romperlo en trozos pequeños 2 a 10; subcultivar en medio de proliferación fresco + higromicina. No subcultivar el tejido marrón y los embriones inmaduros restantes que pueden inhibir aún más el crecimiento de callos sanos.

Subcultivar cada 10 días al seleccionar tejido sano: (embriogénico si está presente) y transferir a medio de proliferación fresco + higromicina. Retirar el callo de color marrón, que se puede inhibir adicionalmente del callo embriogénico.

- 10 30 a 40 días después de bombardeo cambie el procedimiento de selección. En lugar de eliminar el tejido de aspecto malo solo mantenga el tejido embriogénico (eliminar el tejido sano no embriogénico)

Regeneración:

- 15 Después de 40 a 60 días, transfiera el callo embriogénico establecido que muestra crecimiento diferencial en medio de proliferación + higromicina al medio de regeneración + higromicina. Cultive 28°C bajo poca luz durante 10 días luego bajo alta luz durante 10 días adicionales. Compruebe las placas periódicamente a la luz para el desarrollo de embriones y los brotes verdes. A medida que los brotes se desarrollan a veces es beneficioso mover suavemente el brote en desarrollo lejos del callo originado y eliminar el tejido muerto del brote por sí mismo para evitar la inhibición del crecimiento.

Germinación:

- 20 Transfiera de embriones compactos blancos y brotes verdes que inician raíces al medio de germinación bajo alta luz a 28°C durante 1 a 2 semanas. Compruebe periódicamente las placas. Elimine el tejido necrótico y divida los embriones que germinan si es necesario.

Resultados

- 25 Se realizó el análisis de plantas transgénicas utilizando PCR para la inserción de secuencias de flaqueo utilizando los siguientes cebadores para flanco izquierdo de tabaco:

AS548	ACGGTGAAGTAAGACCAAGTCAT	SEQ ID NO.80
AS549	CTAGGTCGGAACAAGTTGATAGGAC	SEQ ID NO.81

Flanco derecho:

AS550	GGCTATGCCATCCTAAGGTGCTGCT	SEQIDNO.82
AS551	CCATGAATGATAAATCATAGATCGAAC;	SEQIDNO.83

- 30 Para flanco izquierdo de arroz:

RC1	CCTGACCCGAAGATGTGGATC	SEQ ID NO.84
RC2	ACATTAGCATGGCGTACTCT	SEQ ID NO.85

flanco derecho:

RC3 AACCAGGAACGGGGAGCTCTC

SEQ ID NO.86

RC4 CGACTCTTTGATCTTAAACTT

SEQ ID NO.87

cebadores internos específicos para el gen aadA:

AS526 GAGTCGATACTTCGGCGATC SEQ ID NO.88
 AS527 AACGTCGGTTCGAGATGG SEQ ID NO.89

5

para el gen mGFP

AS528 TTACCAGACAACCATTACCTGTC SEQ ID NO.90
 AS529 GCTGGGATTACACATGGCAT SEQ ID NO.91

10 El tamaño esperado (1.1 kb) de los productos de PCR se obtuvo para todas las construcciones de tabaco (figura 7). El análisis de secuenciación ha confirmado el sitio de unión entre el transgén y el genoma del plastidio.

El análisis Southern también ha confirmado inserciones de transgenes en la ubicación correcta del genoma del cloroplasto del tabaco (Figura 8).

El análisis Northern indica la presencia de la transcripción del transgén en la fracción del ARN de cloroplastos (Figura 9).

15

Reivindicaciones

1. Un método para transformar plastidios en una células vegetales, el método comprende:

1) introducir en el núcleo de dicha células vegetales una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un promotor nuclear de planta ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de plastidio, una secuencia de traslocación de plastidios (PTS) es decir una secuencia de ARN capaz de unirse a una proteína de unión de PTS de planta, y un dominio de unión de cebador seleccionado de aquel de un retrotransposón o un retrovirus;

2) introducir en el núcleo de dicha células vegetales una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de unión de secuencia de traslocación de plastidios fusionada a un primer péptido de tránsito de plastidio, en el que dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos se une operablemente a un promotor nuclear de planta; y

3) introducir en el núcleo de dicha células vegetales una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de transcriptasa inversa fusionada a un segundo péptido de tránsito de plastidio, en el que la tercera secuencia de ácidos nucleicos se une operablemente a un promotor nuclear de planta que acciona la expresión en un núcleo de células vegetales;

en el que el casete de transgén de plastidio de planta comprende:

i) una secuencia de flanqueo izquierda y una secuencia de flanqueo derecha seleccionada de secuencias de nucleótidos para recombinación homóloga en los plastidios; y

ii) por lo menos un ácido nucleico aislado de interés.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el casete de transgén de plastidio de planta comprende por lo menos un promotor específico de plastidio y por lo menos una secuencia terminadora específica de plastidio.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos aislada es una secuencia de ADN recombinante (por ejemplo cADN) o una secuencia de ADN genómica nativa y aislada introducida seleccionada de secuencias de ácidos nucleicos de mamífero o planta aisladas.

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dominio de unión de cebador es aquel del retrotransposón Ty1 de la levadura.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de PTS se selecciona de viroides de ARN desnudos, virus, dominios de unión a proteína de cubierta viral, ARN de intrón del grupo I y grupo II, sitios de unión de cebador de retrotransposón, o ARN que alberga un dominio es decir se reconoce por proteínas de unión de ARN, tales como la PTS derivada de intrón del grupo II del intrón LtrB de *Lactococcus lactis*.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de ácidos nucleicos de transcriptasa inversa de plastidio se selecciona de ARN de retrotransposón o ARN retroviral tal como del retrotransposón Ty1 de levadura, por ejemplo, transcriptasa-RNasa H inversa.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido de tránsito de cloroplasto de la segunda y tercera secuencia de ácidos nucleicos se selecciona independientemente de la proteína rsbc-cTP de tabaco y la proteína HSP70-cTP de *Arabidopsis*.

8. Un método para producir por lo menos una especie de ARN heteróloga o exógena en una planta, el método comprende:

1) introducir en el núcleo de una células vegetales regenerable una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un promotor nuclear de planta ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de plastidio de planta, una secuencia de traslocación de plastidios de planta es decir una secuencia de ARN capaz de unirse a una proteína de unión de PTS de planta, y un dominio de unión de cebador seleccionado de aquel de un retrotransposón o retrovirus;

2) introducir en el núcleo de dicha células vegetales regenerable una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de unión de secuencia de traslocación fusionada a un péptido de tránsito de plastidio de planta, en el que dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos se une operablemente a un promotor nuclear de planta;

3) introducir en el núcleo de dicha células vegetales regenerable una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica

una proteína de transcriptasa inversa fusionada a un péptido de tránsito de plastidio de planta, en el que la tercera secuencia de ácidos nucleicos se une operablemente a un promotor nuclear de planta;

4) hacer crecer dichas células vegetales regenerables de las etapas 1) a 3);

5) seleccionar una célula vegetal de (4), en la que el transgén comprendido dentro del casete de transgén de plastidio de planta se integra en el genoma de plastidio;

6) regenerar una planta de las células vegetales de (5); y

7) hacer crecer la planta de (6), en la que la especie de ARN heteróloga o exógena codificada por el transgén es decir integrada en el plastidio se expresa como una proteína heteróloga o exógena.

10 9. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que comprende un promotor nuclear de planta ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de plastidio de planta, una secuencia de traslocación de plastidios de planta, y un dominio de unión de cebador, en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15 10. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica una secuencia de traslocación de proteína de unión a plastidios fusionada a un péptido de tránsito de plastidio de planta, en el que la secuencia de polinucleótidos se une operablemente a un promotor nuclear de planta, en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica una proteína de transcriptasa inversa fusionada a un péptido de tránsito de plastidio de planta en el que la secuencia de polinucleótidos se une operablemente a un promotor nuclear de planta, en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

20 12. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende ADN o cADN genómico.

13. Un método para producir una planta, el método incluye incorporar un polinucleótido como se define en cada una de las reivindicaciones 9 a 12 en un núcleo de células vegetales y regenerar una planta a partir de dicha célula.

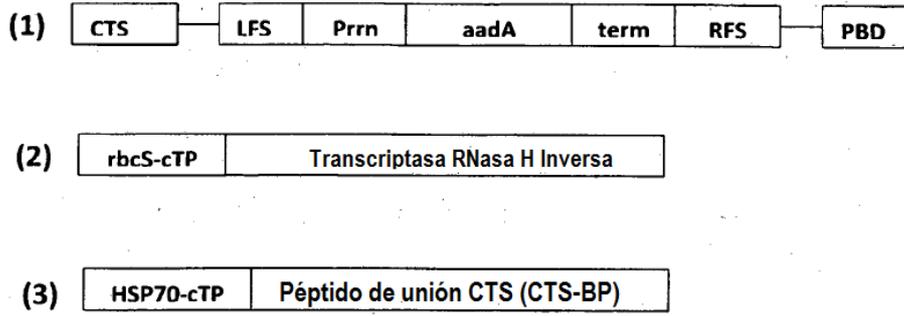


Figura 1

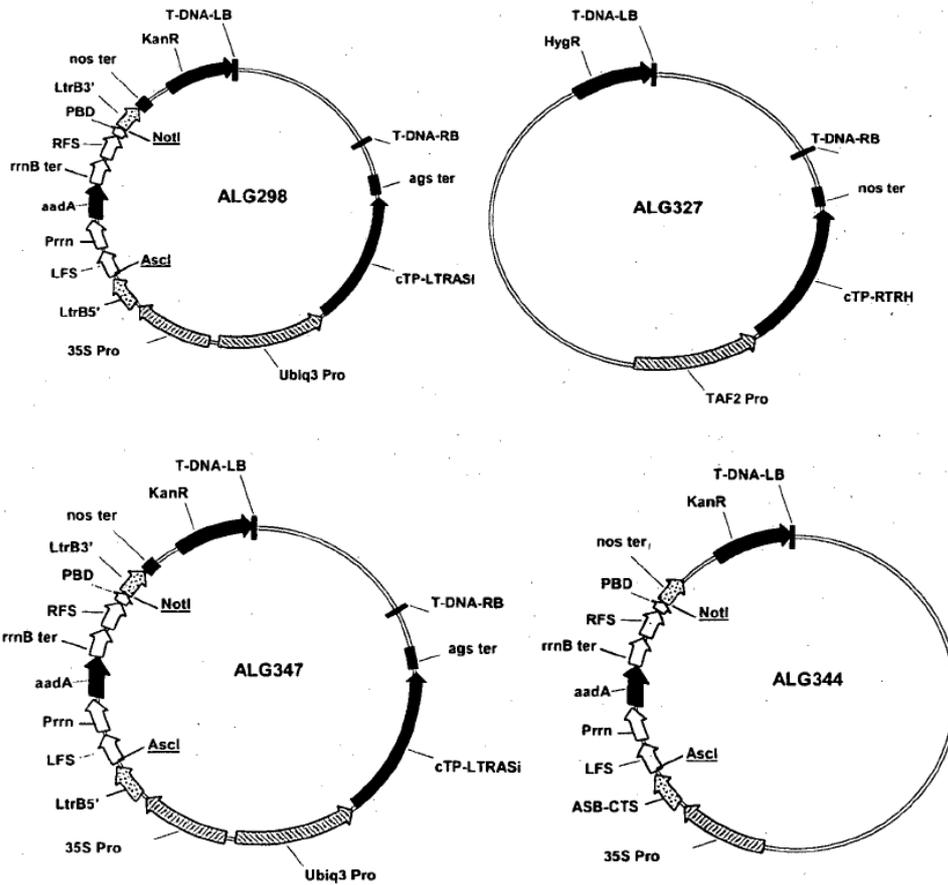


Figura 2

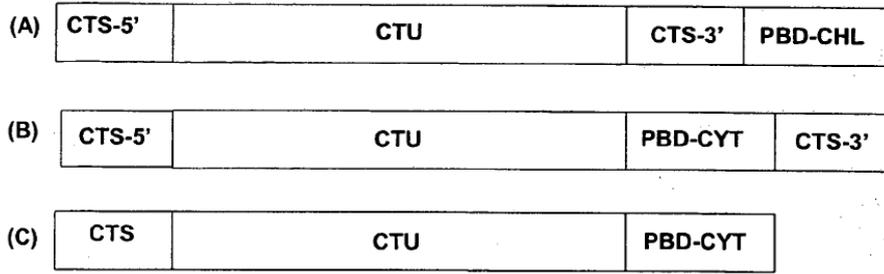


Figura 3

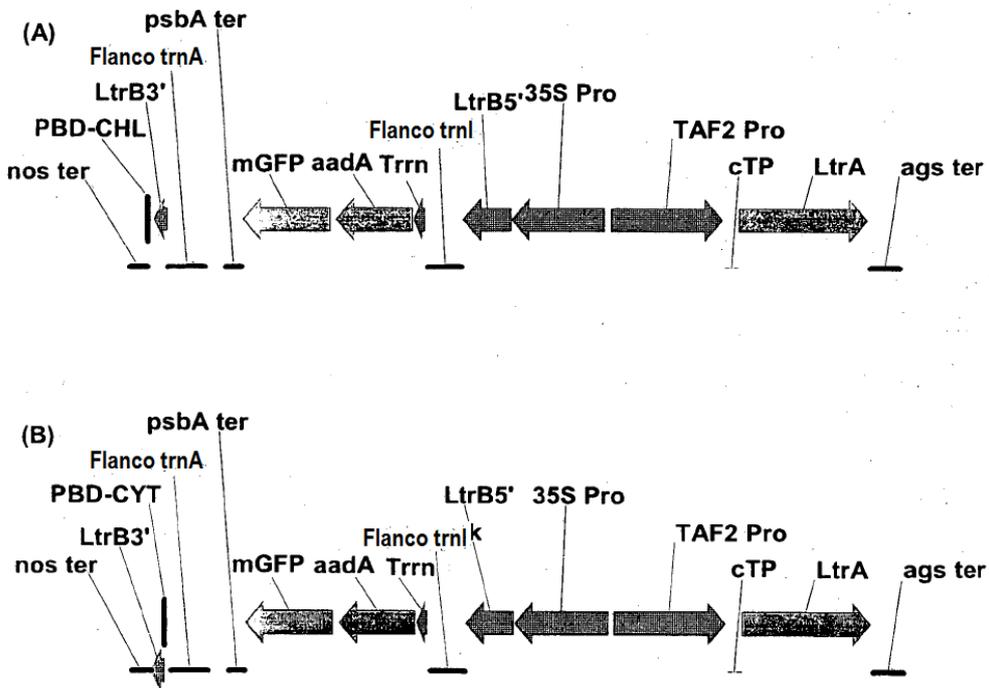


Figura 4

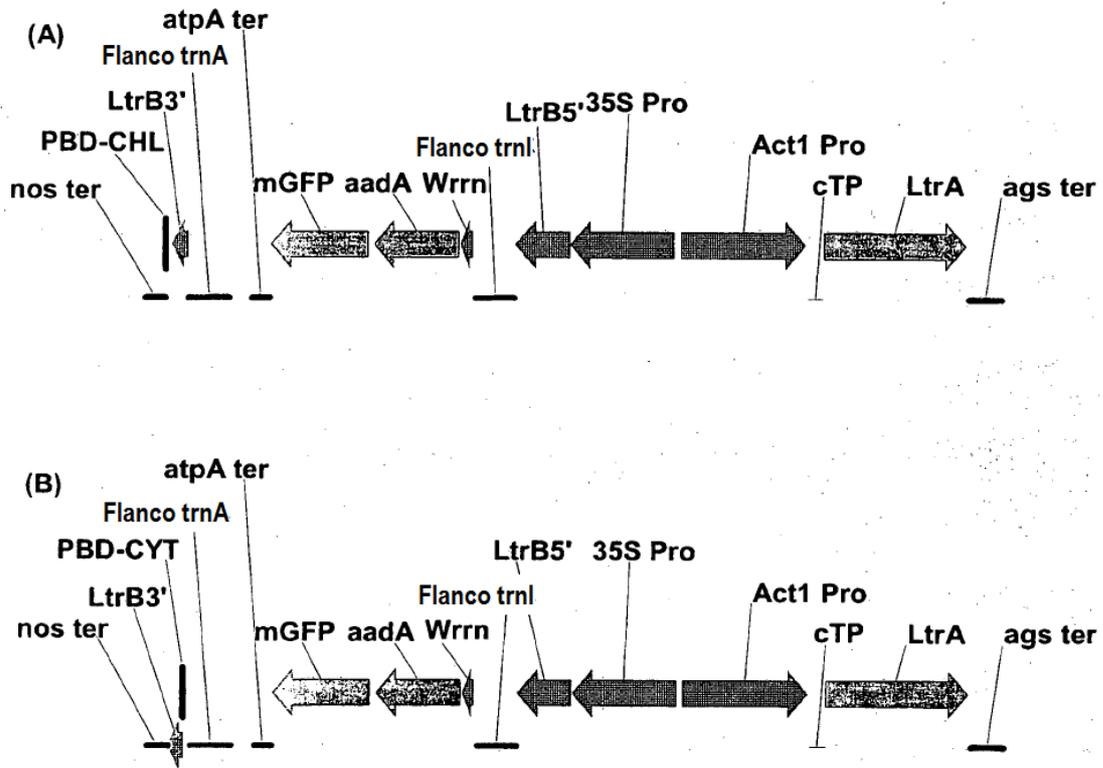


Figura 5

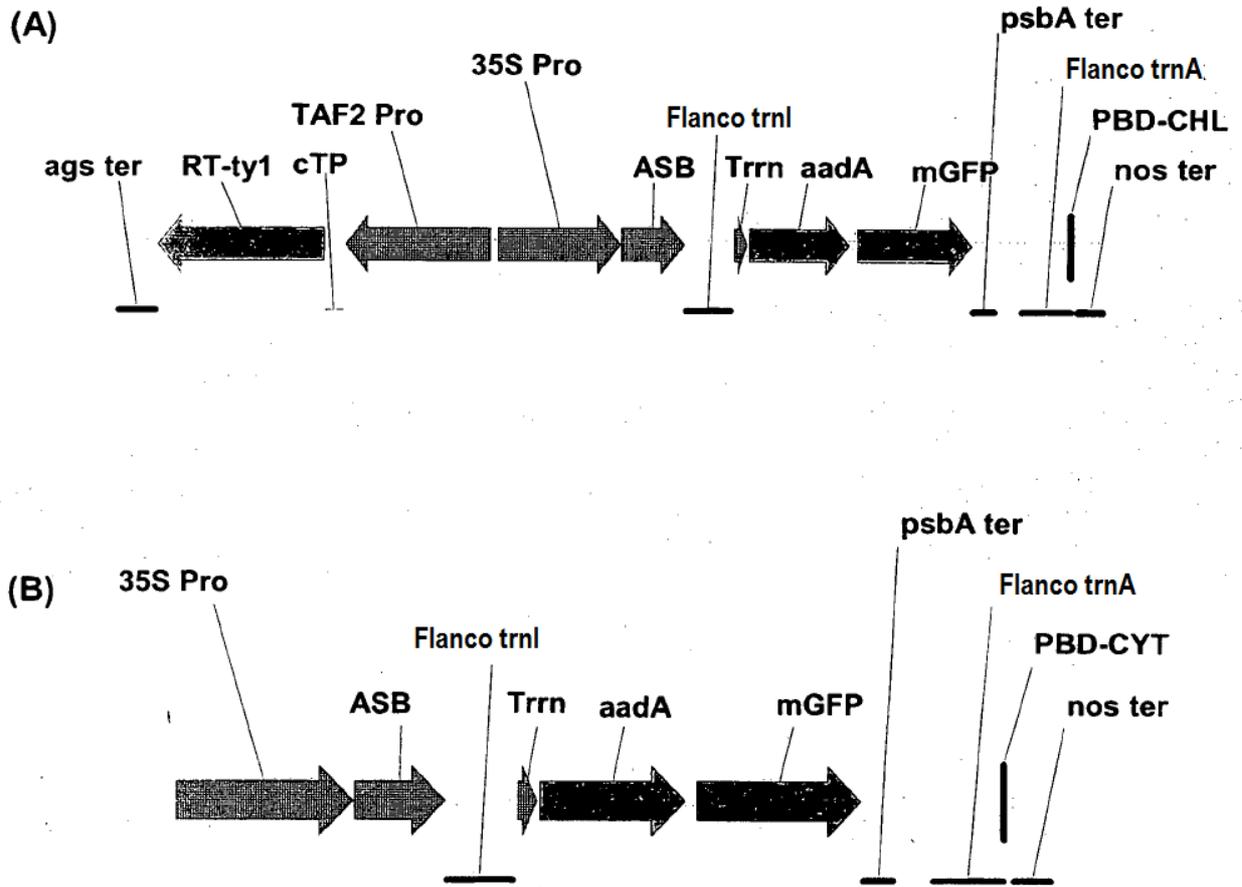


Figura 6

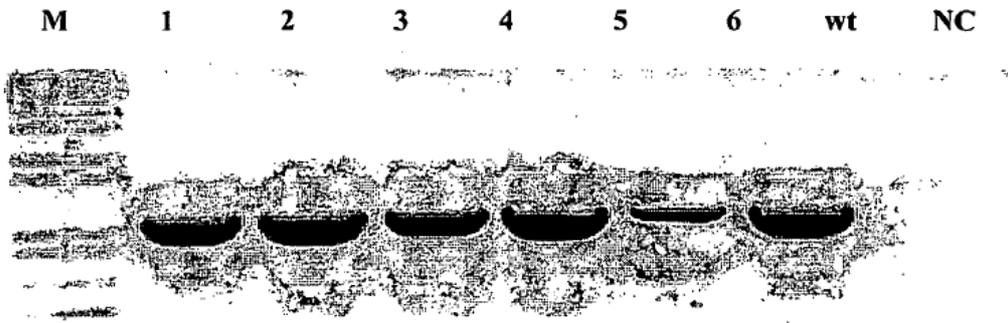


Figura 7

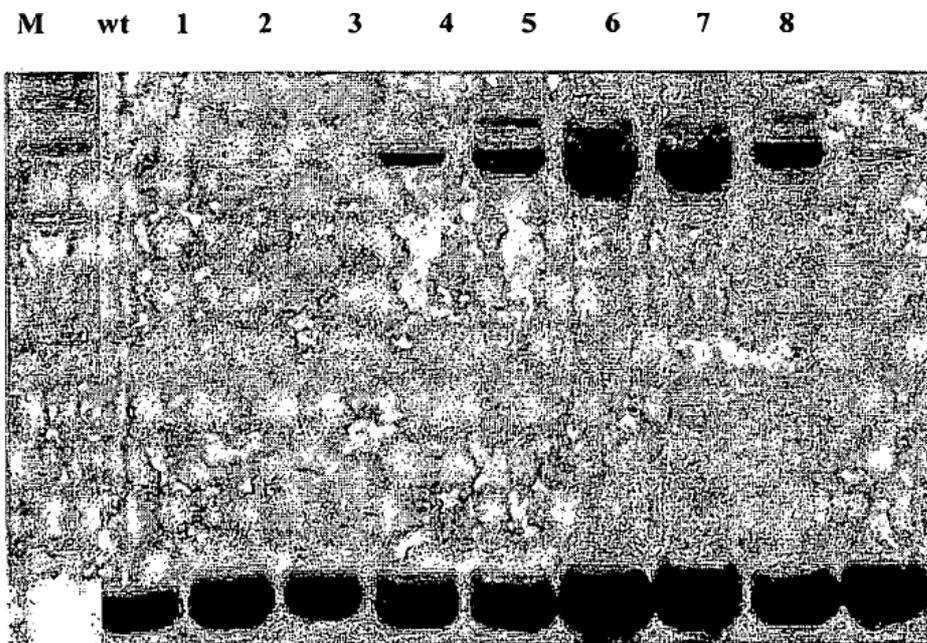


Figura 8

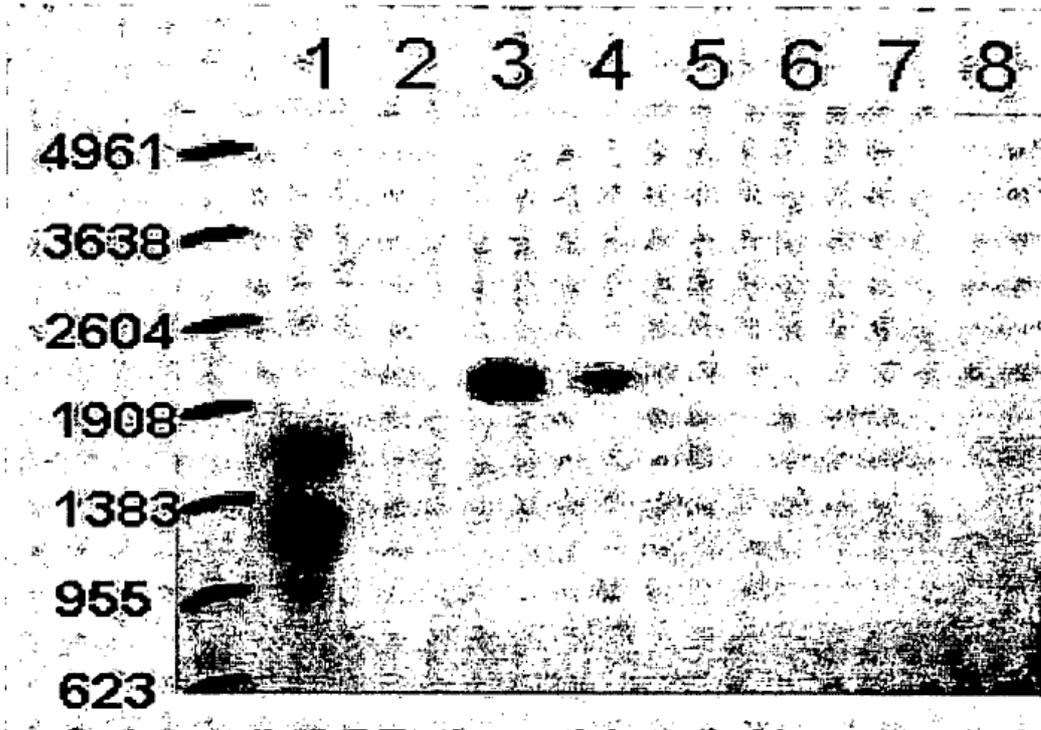


Figura 9